

**Der Einfluss einer CYP1A1-Induktion durch β -Naphthoflavon auf
die CYP3A1-Induzierbarkeit in vitro durch Dexamethason
in Rattenleberschnitten**

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Thomas Demirdag
geboren am 28.04.1978 in Fürth

Gutachter:

1. PD Dr. med. Reinhild Glöckner, Jena
2. PD Dr. med. Heidrun Rhode, Jena
3. PD Dr. med. habil. Martin Kretzschmar, Altenburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 2. November 2010

Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl-hydrocarbon-Rezeptor
BNF	Betanaphthoflavon
bp	Basenpaare
CAR	Constitutive-Androsten-Receptor
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CYP	Cytochrom P 450
DEX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EROD	7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung
KG	Körpergewicht
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NFW	Nuclease-Free-Water
NR	nuclear receptor
PAK	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PB	Phenobarbital
PCN	Pregnenolon-16 α -Carbonitril
PCR	polymerase-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Prot.	Protein
PXR	Pregnenolon-X-Rezeptor
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
TCDD	Tetrachlordibenzodioxine
TH	Testosteronhydroxylierung
WME	Williams Medium E

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	4
1. Zusammenfassung.....	6
2. Einleitung	8
2.1. Bedeutung der Biotransformation.....	8
2.2. Das CYP-System	9
2.3. Die Induktion von CYP	11
2.4. CYP3A und dessen Induktionsmechanismus	12
2.5. Modelle zur Untersuchung der Induzierbarkeit von CYP	14
2.6. CYP3A-Induktion an Präzisionsleberschnitten	17
3. Ziele der Arbeit	22
4. Material und Methoden	24
4.1. Gewinnung und Behandlung von Gewebematerial aus Versuchstieren.....	24
4.1.1. Versuchstiere	24
4.1.2. Vorbehandlung der Tiere	24
4.1.3. Herstellung der Leberschnitte	24
4.1.4. Inkubation der Leberschnitte	25
4.1.5. Homogenisation der Leberschnitte	28
4.2. Bestimmungsmethoden der Biotransformationsaktivität	28
4.2.1. Proteinbestimmung	28
4.2.2. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)	29
4.2.3. Testosteronhydroxylierung (TH)	30
4.3. Bestimmung der CYP3A1-mRNA.....	31
4.3.1. RNA-Isolierung aus Gewebematerial.....	31
4.3.2. Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	31
4.4. Statistik	35

5. Ergebnisse	36
5.1. CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX an Leberschnitten unbehandelter Ratten	36
5.2. CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX an Leberschnitten BNF-vorbehandelter Ratten	37
5.2.1. Nachweis des In-vivo-Effekts von BNF (EROD)	37
5.2.2. Die CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX	38
5.3. Einfluss von BNF in vitro auf die CYP3A1-Induktion durch DEX an Leberschnitten unbehandelter Ratten	40
5.3.1. DEX-Exposition in vitro gleichzeitig mit BNF	40
5.3.1.1. Nachweis des In-vitro-Effekts von BNF (EROD)	40
5.3.1.2. Die CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX	41
5.3.2. DEX-Exposition in vitro nach vorangegangener BNF-Exposition	44
5.3.2.1. Nachweis des In-vitro-Effekts von BNF (EROD)	44
5.3.2.2. Die CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX	45
6. Diskussion	47
6.1. Wirkung von DEX in vitro auf Leberschnitte unbehandelter Ratten	47
6.2. Einfluss von BNF in vivo auf die nachfolgende CYP3A-Induktion in vitro ...	50
6.3. Einfluss von BNF in vitro auf die gleichzeitige und nachfolgende CYP3A1-Induktion in vitro	53
6.3.1. Einfluss von BNF in vitro auf die gleichzeitige CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX	53
6.3.2. Einfluss von BNF in vitro auf die nachfolgende CYP3A-Induktion in vitro durch DEX	55
7. Schlussfolgerungen	59
8. Literaturverzeichnis	60
Anhang	73
Danksagung	74
Ehrenwörtliche Erklärung	75

1. Zusammenfassung

Präzisionsleberschnitte als In-vitro-Modell für Untersuchungen der Cytochrom P-450 (CYP)-Induktion haben sich bewährt. Im Hinblick auf Speziesunterschiede ist der Einsatz von Humanleberschnitten für Induktionsversuche sinnvoll. Menschliches Gewebe kann aber im Gegensatz zu Versuchstiergewebe nicht standardisiert vorliegen. Die Einflüsse von genetischem Polymorphismus, Krankheiten, Medikamenten oder Lebensgewohnheiten wie z.B. Rauchen führen zu einem individuell ausgeprägten CYP-Expressionsmuster. Die daraus bedingte Variabilität des Spendergewebes könnte CYP-induzierende Eigenschaften von zu prüfenden Substanzen im In-vitro-Versuch maskieren. Die Beurteilung von Ergebnissen aus Versuchen mit humanem Gewebe bleibt somit trotz beseitigter Speziesunterschiede problematisch. Es stellt sich daher die Frage nach der Bedeutung des Ausgangszustandes vom Spendergewebe auf nachfolgende CYP-Induktionen in vitro. Systematische Studien zur In-vitro-Induzierbarkeit einer anderen CYP-Familie mit Leberschnitten aus bereits in vivo induziertem Spendergewebe liegen noch nicht ausreichend vor. Aus ethischen Gründen ist für solche grundlegenden Untersuchungen zunächst der Einsatz von Tiergewebe sinnvoll.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses einer CYP1A-Expression im Spendergewebe, ausgelöst durch β -Naphthoflavon (BNF), auf die nachfolgende CYP3A1-Induktion in vitro durch den Modellinduktor Dexamethason (DEX) an Präzisionsleberschnitten von Ratten. Dabei sollte geklärt werden, ob sich eine In-vivo-Vorbehandlung des Spendergewebes mit BNF auf eine nachfolgende CYP3A1-Induktion auswirkt, ob eine CYP1A-Induktion in vitro eine zeitgleiche CYP3A1-Induktion maskieren könnte und ob In-vivo-Vorbehandlungen der Ratten mit BNF durch In-vitro-Vorinkubationen ersetzt werden könnten. Zum Einsatz kamen Leberschnitte von ca. 40 Tage alten, weiblichen Wistar-Ratten. Die CYP-3A1-Induktion wurde durch eine 24-stündige Inkubation mit DEX (0,01-10 μ M) ausgelöst und auf Enzymaktivitäts- (2β - und 15β -TH) und mRNA-Ebene (kompetitive RT-PCR) nachgewiesen. Die CYP1A-Induktion durch BNF wurde mittels EROD auf Enzymaktivitätsebene belegt.

Die In-vivo-Induktion von CYP1A erfolgte durch einmalige per os Verabreichung von BNF (5 mg/100 g KG) 24 Stunden vor Dekapitation. Die CYP1A-Induktion war

anhand der gesteigerten EROD vor Schnittpräparation ersichtlich (2425 ± 251 pmol x min⁻¹ x mg Prot⁻¹; n=6), klang innerhalb der 24-stündigen Schnittinkubation wieder ab, erreichte jedoch noch nicht das Ausgangsniveau unbehandelter Lebern (218 ± 27 pmol x min⁻¹ x mg Prot⁻¹; n=10). Das Abklingen der EROD konnte in Gegenwart von DEX konzentrationsabhängig verzögert werden. Die konzentrationsabhängige Induktion von CYP3A1 durch DEX war an Leberschnitten vorbehandelter in gleichem Maße wie an Leberschnitten unbehandelter Tiere möglich, wie anhand der gesteigerten 2 β - und 15 β -TH sowie mRNA-Expression gezeigt werden konnte. Die In-vivo-Vorbehandlung der Ratten mit BNF hatte somit keinen wesentlichen Einfluss auf die nachfolgende konzentrationsabhängige Induktion von CYP3A1 durch DEX. Bei simultaner Inkubation mit BNF (10 μ M) und DEX (0,01-10 μ M) von Leberschnitten unbehandelter Tiere zeigte sich nach 24 Stunden eine erfolgte CYP1A-Induktion anhand gesteigerter EROD-Aktivität. Im Vergleich zu Kontrollgruppen mit BNF allein, vermochte die Gegenwart von DEX die EROD konzentrationsabhängig zu verstärken (bis zu 4-fach höhere Aktivität mit DEX 10 μ M), wobei DEX allein keine EROD-Steigerung verursacht. Die CYP3A1-Induktion durch DEX war durch BNF dagegen unbeeinflusst. Sie wurde anhand der induzierten 2 β - und 15 β -TH eindeutig nachgewiesen. Auch die CYP3A1-mRNA-Konzentration war deutlich erhöht. Bei sukzessiver Inkubation mit BNF und DEX (jeweils 24 Stunden) konnte unmittelbar nach BNF-Exposition erwartet eine gesteigerte EROD gemessen werden. Diese wurde in Gruppen mit nachfolgender DEX-Exposition konzentrationsabhängig aufrecht erhalten. Die CYP3A1-Induktion durch DEX konnte auch hier auf beiden Ebenen ungestört erfolgen. Dabei schien die Vorinkubation mit BNF die TH-Induzierbarkeit zu verbessern. Auf In-vivo-Vorbehandlungen von Tieren mit BNF könnte somit verzichtet werden.

Aus den Ergebnissen der Arbeit geht hervor, dass Lebern weiblicher Ratten mit vorbestehender CYP1A-Induktion eine CYP3A1-Induktion in vitro nicht maskieren, uneingeschränkt für Untersuchungen von CYP3A1-induzierenden Substanzen in vitro eingesetzt werden können und der Nachweis sowohl auf Enzymaktivitäts- (2 β - und 15 β -TH) als auch auf mRNA-Ebene sicher erfolgen kann.

2. Einleitung

2.1. Bedeutung der Biotransformation

Jedes Lebewesen ist Fremdstoffen ausgesetzt, entweder durch Nahrungsaufnahme, als Arzneimittel oder im Rahmen des Umwelteinflusses. Lipophile Substanzen können besonders gut resorbiert werden und sich in Zellstrukturen wie lipidhaltigen Membranen oder auch im Fettgewebe einlagern. Aufgrund dieser Eigenschaft ist die Ausscheidung dagegen schwer oder nur sehr langsam möglich. Die Akkumulation von Xenobiotika kann Stoffwechselprozesse stören oder durch Erreichen einer toxischen Konzentration den Organismus gefährden. Um dem entgegenzuwirken haben Organismen im Laufe der Evolution Möglichkeiten entwickelt, lipophile Verbindungen in hydrophilere Produkte umzuwandeln, welche dadurch besser z.B. über Gallensekret oder Urin wieder ausgeschieden werden können. Dieser Umwandlungsprozess erfolgt durch verschiedene Enzymsysteme und wird als Biotransformation bezeichnet. Sie findet im Körper ubiquitär statt, zu einem wesentlichen Anteil jedoch in der Leber (Axelrod 1960, Gillette 1963, Estler 2000, Aktories et al. 2005). Die Biotransformation hat ihre essentielle Bedeutung nicht nur in der Elimination von Fremdstoffen, sondern auch endogene lipophile Substanzen wie z.B. Steroidhormone müssen metabolisiert werden um die Homöodynamik des Organismus zu gewährleisten. Neben der Lipophilie können auch Wirkungseigenschaften der Xenobiotika verändert werden. Als wichtiges Beispiel in der Pharmakologie sei die Anwendung von sogenannten Prodrugs erwähnt, in denen der Arzneistoff erst durch die erwartete Biotransformation seine Wirksamkeit erhält, im besten Falle am erwünschten Wirkungsort. Die Enzyme können generell nicht zwischen schädlichen und nützlichen Verbindungen unterscheiden. Je nach Intermediärprodukt oder endgültigem Produkt spricht man daher von der für den Organismus nachteilhaften metabolischen „Giftung“ oder der vorteilhaften „Entgiftung“.

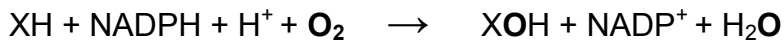
Die Biotransformation erfolgt meist in zwei Phasen, wobei nicht immer beide durchlaufen werden müssen. In der funktionalisierenden Phase I erfahren unpolare (lipophile) Substrate durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse eine Transformation, in der funktionelle polare Gruppen eingeführt oder freigesetzt werden. In der konjugierenden Phase II kann durch eine Konjugation endogener Verbindungen (z.B. Glucuronsäure, Sulfat, Acetat, Glutathion, etc.) an funktionelle

Gruppen eine noch stärkere Polarität und damit Wasserlöslichkeit der Molekülstruktur erreicht werden.

In der Erforschung der Biotransformation konnte als wesentlich beteiligtes Enzym neben Esterasen, Transferasen, Hydrolasen das Cytochrom P450-System (CYP) entdeckt werden. Heute wissen wir, dass das CYP-System u.a. eine entscheidende Rolle in der oxidativen Phase I der Metabolisierung von den meisten Pharmaka einnimmt.

2.2. Das CYP-System

Im Jahre 1958 wurde erstmalig das CYP als ein Pigment in Mikrosomen von Rattenlebern beschrieben (Klingenberg 1958, Garfinkel 1958). In den Folgejahren wurde das Pigment als Hämoprotein identifiziert (Omura und Sato 1962) sowie die Erkenntnis über deren Beteiligung in der Synthese und Metabolisierung endogener Substrate (z.B. Steroidhormone, Gallensäuren, Fettsäuren, Arachidonsäuren, Vitamin D₃, etc.) und Fremdstoffe wie Arzneimittel erlangt (Cooper et al. 1965). Die Bezeichnung P-450 begründet sich auf das Absorptionsmaximum des Hämoproteins bei 450 nm im reduzierten Zustand mit Kohlenmonoxid, P steht für das initial als Pigment gehaltene Hämoprotein. Das CYP agiert als Hauptkatalysator der Phase I der Biotransformation in Form eines Enzymsystems bestehend aus dem Hämoprotein P450 (funktionelle Einheit) und einem Flavoprotein. Das Flavoprotein wirkt mit dem Cofaktor NADPH als NADPH-CYP-Reduktase und überträgt pro Reaktion insgesamt 2 Elektronen auf das substratbeladene Hämoprotein. Das zweite Elektron kann alternativ auch vom Cytochrom b₅ übertragen werden. Des Weiteren sind molekularer Sauerstoff und Phospholipide für den Reaktionsablauf erforderlich (Strobel et al. 1970, Yamazoe et al. 1988, Aktories et al. 2005, Isin und Guengerich 2008). Das Enzymsystem wird korrekter als CYP-abhängige Monooxygenase bezeichnet. Monooxygenasen sind Enzyme die molekularen Sauerstoff aktivieren und nur ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und es dadurch oxidieren, das zweite Atom dagegen zu Wasser reduzieren. Die CYP katalysierte Reaktion lässt sich in folgender Gleichung stark vereinfacht zusammenfassen:



(XH: Substrat; XOH: oxidierte Form des Substrats)

Es sind sehr viele CYP-Isoenzyme bekannt, welche evolutionär aus einem Gen entstammten. Die Einteilung erfolgt aufgrund der Sequenzhomologie der Aminosäuren (Nebert et al. 1989). Bei Sequenzhomologie von mehr als 40% werden die Enzyme einer Genfamilie zugeordnet und mit einer arabischen Zahl nach dem Präfix CYP beziffert (z.B. CYP1). Bei Subfamilien stimmen die Aminosäuren zu mehr als 55% überein, diese werden mit einem großen Buchstaben bezeichnet, welche der arabischen Zahl nachgestellt wird (z.B. CYP1A). Einzelne Isoformen der Subfamilien werden wieder mit einer arabischen Zahl benannt (z.B. CYP1A2), in der Zahlenfolge nach der sie entdeckt oder erstmals beschrieben wurden. Unterschiedliche Allele des selbigen Enzyms werden als Ziffer mit einem Stern der Gesamtbezeichnung nachgestellt (z.B. CYP1A2*2). Beim Menschen wurden bisher 18 Genfamilien mit 44 Subfamilien identifiziert, wobei für die Metabolisierung von Xenobiotika etwa drei Genfamilien (CYP1, 2 und 3) relevant sind. Die anderen CYP sind vermehrt an der Synthese und Biotransformation endogener Stoffe beteiligt (Aktorjes et al. 2005).

Das Besondere an den fremdstoffmetabolisierenden CYP ist deren relative Substratspezifität und z.T. deren überlappendes Substratspektrum. Zusammen mit der hohen Anzahl an Isoenzymen besteht als Ganzes betrachtet ein äusserst anpassungsfähiges Enzymsystem, welches dem Organismus eine Adaptation an wechselnde Umwelteinflüsse erst ermöglicht. So werden mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die in Zukunft entwickelten Xenobiotika umgesetzt werden können. Die Unspezifität birgt jedoch die Gefahr, dass wie in Abschnitt 2.1. beschrieben, kurzlebige reaktive Intermediärprodukte oder Endprodukte entstehen. Mitunter ist die Entstehung abhängig von der CYP-Familie, die das Substrat umsetzt. Diese Produkte könnten z.B. mit DNA-Strukturen oder Proteinen interagieren und eine mutagene, karzinogene oder teratogene Wirkung ausüben, wenn sie nicht rasch durch weitere Biotransformation entgiftet werden können (Estler 2000).

Anzahl und Aktivität der CYP variieren nicht nur stark innerhalb der Spezies sondern auch innerhalb der Individuen (Parkinson 1996). Es sind verschiedene Einflussfaktoren bekannt. Neben Umgebungsfaktoren sind genetische Faktoren

wie z.B. Polymorphismus, Geschlecht, Stammesangehörigkeit und individuelle Faktoren wie z.B. Erkrankungen, hormoneller Status und Ernährung von Bedeutung (Pelkonen et al. 1994, Kamataki et al. 1985). Auch innerhalb eines Individuums zeigt sich im Altersverlauf eine unterschiedliche Expression und Aktivität von CYP (Klinger 1982). Die Kenntnisse dieser Unterschiede müssen in der Anwendung von Arzneimitteln berücksichtigt werden, da sie einen direkten Einfluss auf den Wirkspiegel und die erwünschte oder auch unerwünschte Wirksamkeit (z.B. Toxizität) haben könnten. Auf dem Markt sind inzwischen Gen-Chips erhältlich, die einzelne Isoformen der wichtigsten arzneimittelmetabolisierenden CYP identifizieren können, um Wirkungen und Nebenwirkungen bestimmter Medikamente mit besonderem Risiko z.B. engem therapeutischen Konzentrationsbereich an Patienten eher einschätzen zu können. So ist es z.B. möglich die Metabolisierungsfähigkeit eines Patienten für ein Arzneimittel in „poor“, „intermediate“, „normal“ oder „ultrarapid“ einzustufen.

2.3. Die Induktion von CYP

Wie im letzten Abschnitt erwähnt, ist die Aktivität der CYP dynamisch. Für Organismen ist dies essentiell, um sich veränderten Fremdstoffbelastungen anpassen zu können. Die Biotransformationsaktivität kann über verschiedene Wege beeinflusst werden. Zum einen können schon vorhandene CYP in ihrer Struktur durch Modifikation stabilisiert und inaktive Enzyme rekrutiert werden. Zum anderen ist eine Induktion, d.h. gesteigerte de novo Synthese von CYP möglich. Hierbei werden über molekulare Regulationsmechanismen die Transkriptionsraten entsprechender Gene erhöht oder deren Transkription erst initialisiert. Des Weiteren sind Prozesse an regulierenden Transkriptionsfaktoren (z.B. Phosphorylierung und Dephosphorylierung) bekannt. Sind Lebewesen wiederholt Fremdstoffen ausgesetzt oder haben diese Substanzen aufgrund der physikochemischen Eigenschaften eine sehr lange Verweildauer im Organismus, so kann deren Metabolisierung auf diese Art meist innert weniger Stunden oder Tage beschleunigt werden, um eine Akkumulation zu verhindern. Zahlreiche Xenobiotika haben das Vermögen die an ihrer Biotransformation beteiligten Isoenzyme zu induzieren. Das Wissen welche Enzyme von ihnen induziert oder auch gehemmt werden und in welchem Maße dies passiert, ist von hoher Relevanz für

die Pharmakologie und Toxikologie um Aussagen über erwartete Wirkungen und Nebenwirkungen treffen zu können. Gemäß bisherigen Forschungsergebnissen kann eine grobe Einteilung in fünf Typenklassen nach induzierenden Substanzen, sog. Modellinduktoren, vorgenommen werden. Tabelle 2.1. präsentiert eine Übersicht (Parkinson 1996).

Tabelle 2.1.: Induktorklassen für CYP in Rattenlebern (modifiziert nach Parkinson 1996). TCDD=Tetrachlordibenzodioxine; PCB=Polychlorierte Biphenyle; PP=Peroxisomen Proliferatoren.

Modellinduktoren	Hauptinduzierbare CYP-Enzyme
3-Methylcholanthren, β -Naphthoflavon, TCDD, planare PCB	CYP1A1 und 1A2
Phenobarbital, Antioxidantien, Antihistaminika, nonplanare PCB	CYP2B1 und 2B2
Pregnenolone-16 α -carbonitril, Dexamethason, Troleandomycin	CYP3A1 und 3A2
Isoniazid, Pyrazole, Ethanol, Aceton	CYP2E1
Clofibrat und andere PP	CYP4A1-3

2.4. CYP3A und dessen Induktionsmechanismus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Induzierbarkeit von CYP3A1 untersucht. Die Familie der CYP3A kommt vor allem in der Leber und im Intestinum vor und repräsentiert über 35% des gesamten hepatischen CYP-Systems. Zusammen mit den Enzymfamilien CYP2B, 2C und 2D ist sie im Wesentlichen für die Verstoffwechslung von Arzneimitteln und Fremdstoffen verantwortlich (Thummel und Wilkinson 1998, Pelkonen et al 2008). Es wird geschätzt, dass bis zu 60% der angewandten Arzneimittel (z.B. Makrolidantibiotika, Antimykotika, Kontrazeptiva, Virustatika, Kalziumkanalblocker, Protonenpumpen-Inhibitoren, etc.) durch CYP3A metabolisiert werden, weshalb auch viele Medikamenteninteraktionen auf die Induktion oder Inhibierung dieser Enzymfamilie zurückzuführen sind (Maurel 1996, Guengerich 1999, Li et al. 1995, Michalets 1998, Goodwin et al. 2002). Des Weiteren sind CYP3A an der Metabolisierung von endogenen Substanzen wie Stereoiden oder Gallensäuren beteiligt. Ein Modellinduktor für CYP3A stellt DEX dar, man spricht daher auch vom DEX-Typ (Parkinson 1996). Im Folgenden wird die Induktion vom DEX-Typ kurz charakterisiert. Nicht alle Details des Induktionsmechanismus von CYP3A konnten bisher aufgeklärt werden. In den letzten Jahren

konnten jedoch Untersuchungen belegen, dass sogenannte nuclear receptors (NR) bei der Transkriptionsaktivierung von CYP3A-Genen eine Schlüsselfunktion besitzen. Zu diesen NR zählt der Pregnane-X-Rezeptor (PXR), welcher nur im Nucleus lokalisiert sein soll und in jenem Gewebe vorkommt, in welchem auch CYP3A exprimiert wird (Goodwin et al. 2002). Entgegen bisheriger Annahmen konnten Squires et al. (2004) erstmalig inaktivierte PXR bei Mäusen auch im Cytoplasma nachweisen. Der Induktor, z.B. DEX, fungiert als Ligand für PXR und aktiviert diesen vermutlich auf allosterischem Wege. Der aktivierte PXR bildet anschließend mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ein Heterodimer. Dieser PXR-RXR-Komplex vermag mit Promotor- oder Enhancer-Sequenzen der DNA, sog. responsive elements zu interagieren und die Transkription der CYP3A-Gene sowie der Gene von Cofaktoren zu initialisieren (Waxman 1999). PXR scheint als NR keine hohe Ligandenspezifität zu besitzen, da dessen Aktivierung durch zahlreiche Xenobiotika verschiedenster chemischer Strukturen erfolgen kann. Diese Eigenschaft basiert auf einer sehr hydrophoben und flexiblen Ligandenbindungsregion am PXR-Molekül. Des Weiteren ist der Glucocorticoidrezeptor-Antagonist Pregnenolon-16 α -Carbonitril (PCN) ein weiterer PXR-vermittelter Modellinduktor für CYP3A. Somit kann es sich bei PXR auch nicht um einen klassischen Stereoidrezeptor handeln (Blumberg und Evans 1998). Unterstützt wird dies auch durch eine relativ hohe notwendige Induktorkonzentration, Glucocorticoidrezeptoren sind im Vergleich hierzu mit geringeren Konzentrationen aktivierbar (Sueyoshi und Negishi 2001). Aufgrund des breiten Spektrums der möglichen Liganden wird PXR auch als Stereoid- oder Fremdstoff-Sensor bezeichnet (Waxman 1999). In der Literatur findet sich daher der Begriff Stereoid-Xenobiotic-Rezeptor (SXR) als Synonym für die humane Form des PXR (Gunderson et al. 2006).

CYP3A lässt sich mitunter, wenn auch nur in geringerem Maße, durch Phenobarbital (PB) induzieren. PB gilt als Modellinduktor des CYP2B (Parkinson 1996). Die Induktion nach dem „PB-Typ“ erfolgt über den Constitutive-Androstane-Rezeptor (CAR), der ebenfalls den NR zugeordnet wird, jedoch im Cytosol lokalisiert ist und erst nach Bindung des Liganden in den Nucleus wandert und nach Heterodimerisierung mit RXR an responsive elements der DNA ansetzt. CAR wird daher als weiterer beteiligter NR bei der Induktion von CYP3A diskutiert. Die Bezeichnung „constitutive“ basiert auf der Eigenschaft von CAR auch ohne

Induktorpräsenz mit RXR ein Heterodimer zu bilden und über responsive elements der DNA die Transkription von CYP2B-Genen zu aktivieren. Diese Aktivierung wird aber normalerweise durch endogene Liganden, Androgene (Androstanol oder Androstenol), inhibiert (Forman et al. 1998). Vermutlich werden diese von CAR durch PB oder andere Induktoren kompetitiv verdrängt und die Inhibition der Genexpression von CYP-Genen aufgehoben. Eine allosterische Bindung an CAR oder eine Hemmung der Bildung der beiden inhibierenden endogenen Liganden, z.B. durch Änderung des Phosphorylierungsstatus von beteiligten Enzymen werden ebenfalls als mögliche Mechanismen betrachtet (Waxman 1999). Des Weiteren wird vermutet, dass die oben genannten Androgene die Interaktion des CAR-RXR-Komplexes mit der responsive-elements-region der DNA verhindern.

Die Initialisierung der Induktion eines Enzyms über verschiedene NR, hier PXR und CAR, und somit auch verschiedene Induktorgruppen wird auch als Cross Talk bezeichnet. Sie beruht auf dem Phänomen der Übereinstimmung von Abschnitten der responsive elements an der DNA für beide NR. Für CYP3A sind drei responsive regions identifiziert worden. Der PXR-RXR Komplex vermag an allen drei korrespondierenden Bindungsregionen der DNA zu interagieren und somit die maximale Transkriptionsrate herbeizuführen (Sueyoshi und Negishi 2001).

2.5. Modelle zur Untersuchung der Induzierbarkeit von CYP

Bevor eine Substanz als Arzneimittel zugelassen werden kann, muss deren Eigenschaft bezüglich Metabolisierung, Wirkung und Enzyminduktion genauestens charakterisiert sein. Hierfür sind grundlegende systematische Untersuchungen direkt am Menschen aus ethischen Gründen nicht vertretbar. Die Pharmakologie und Toxikologie wendet daher zur Erforschung der Fremdstoffwirkung alternativ Tierversuche an. In der klassischen Form dieser Versuche werden die zu untersuchenden Verbindungen den Labortieren in vivo verabreicht und anschließend deren Wirkung in vivo oder ex vivo untersucht. Für systematische Tests bedarf es jedoch einer sehr hohen Anzahl an Tieren. Bestehende interindividuelle Unterschiede der Enzymexpression, Enzymaktivität und der Induzierbarkeit (in Abschnitt 2.2. beschrieben) führen zudem zur hohen Variabilität der Versuchsergebnisse. In der aktuellen Forschung werden daher weitestgehend Untersuchungen an In-vitro-Modellen durchgeführt. In diesen kommen Gewebeanteile,

Zellen oder Zellbestandteile zur Anwendung, so dass z.B. mit Material eines einzelnen Individuums zahlreiche Parallelversuche (z.B. Kontroll- und Versuchsgruppen) möglich sind. Interindividuelle Unterschiede können minimiert werden, und durch die Reduktion der notwendigen Tieranzahl kann auch der ethischen Verantwortung entsprochen werden, Tierversuche möglichst zu vermeiden. Des Weiteren kann durch die Effizienz der In-vitro-Modelle die Ausnutzung von sehr begrenzt zur Verfügung stehendem Material (z.B. Humangewebe) optimiert werden.

Die Übertragung von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen ist nicht direkt möglich, da Speziesunterschiede zu berücksichtigen sind. Ein Modellinduktor vermag nicht bei allen Spezies die gleichen Enzyme zu induzieren. Grundlage hierfür stellen z.B. geringfügige Strukturunterschiede an den Ligandenbindungsstellen der NR der verschiedenen Spezies dar (Stanley et al. 2006). Durch Charakterisierung der Eigenschaften von CYP verschiedener Spezies und deren individueller Einteilung in Ähnlichkeit der Enzymaktivität, -kinetik und Enzyminhibition bei bestimmten Substraten im Vergleich zur menschlichen CYP-Isoform lassen sich In-vitro-Modelle von unterschiedlichen Tierspezies anwenden, deren Ergebnisse sich auf den Menschen gut extrapolieren lassen (Bogaards et al. 2000).

Für Untersuchungen zur Enzyminduktion bedarf es In-vitro-Modelle mit intakten und differenzierten Zellen, deren Proteinsyntheseapparate funktionsfähig sind. Hierfür haben sich u.a. Modellsysteme mit Hepatozyten oder Leberschnitten bewährt (Lake et al. 1996, Lerche-Langrand und Toutain 2000, Jessen et al. 2003). Beide Systeme können die in vivo vorkommenden komplexen Metabolismusvorgänge und Zell-Zell-Interaktionen nicht vollständig imitieren, ermöglichen aber dennoch die Erforschung einzelner isolierter Prozesse der Fremdstoffmetabolisierung und CYP-Induktion. Des Weiteren ist keines der beiden Systeme uneingeschränkt für alle Experimente vorteilhaft. Die wissenschaftliche Fragestellung entscheidet daher oft über deren Eignung für die Untersuchung (Jessen et al. 2003). Die Isolation von Hepatozyten aus frischen Lebern erfolgt mit proteolytischen Enzymen. Die Zellmembranen und Transportproteine können hierbei beschädigt werden (Smith et al. 1985), die interzellulären Kontakte gehen durch die Isolation verloren. Dies führt zu einer raschen Entdifferenzierung mit Verlust

spezifischer Zellfunktionen. Hepatozytensuspensionen haben hierbei die kürzeste Überlebensdauer und sind daher für Induktionsversuche weniger geeignet. Hepatozytenkulturen zählten lange Zeit zum Goldstandard, es sind jedoch aufwendige und komplexere Kulturverfahren (Sandwichkulturen und Kokulturen) notwendig um einer schnellen Entdifferenzierung entgegen zu wirken (Bjornsson et al. 2003, Guillouzo 1998). Im Gegensatz zu Modellen mit isolierten Hepatozyten bleibt in Präzisionsleberschnitten die ursprüngliche Gewebearchitektur weitgehend erhalten, da keine enzymatische Auftrennung erfolgen muss. Zellschäden durch proteolytische Enzyme können daher vermieden werden. Traumata kommen meist nur an Zellen der Schnittfläche vor. Im heterogenen Zellverband befinden sich neben den Hepatozyten auch weitere Zellarten wie Kupfferzellen und Endothelzellen, deren indirekte oder direkte Beteiligung an der Giftung von Xenobiotica bekannt ist (Edwards et al. 1993, Nastevska et al. 1999). Zudem bleibt die Polarität der Hepatozyten im Gewebeverband erhalten. Intramembranöse Transportproteine bleiben funktionsfähig, die erhaltenen Zell-Zell-Kontakte und Interaktionen führen zu einer wesentlich langsameren Entdifferenzierung als bei isolierten Hepatozyten (Ekins 1996, Fisher et al. 1991).

1923 wurden durch Otto Warburg erstmals Leberschnitte für In-vitro-Versuche eingesetzt. Durch die damalige noch manuelle Schnitterfertigung entstanden relativ dicke Leberschnitte. Die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung war dadurch erschwert, sodass häufig Nekrosen im Schnittinneren auftraten und nur Kurzzeitstudien möglich waren. Erst durch die Entwicklung des Krumdieck-Tissue-Slicers im Jahre 1980 konnten reproduzierbare Leberschnitte mit optimaler Dicke in einem einfachen, zügigen, effizienteren, nur gering traumatisierenden und für alle Spezies identischen Verfahren gewonnen werden (Krumdieck et al. 1980, Ekins 1996, Lerche-Langrand und Toutain 2000). Die frischen Leberschnitte lassen sich sofort für die Inkubationen anwenden und auch kryokonservieren, ohne wesentlichen Funktionsverlust wie dies bei isolierten Hepatozyten stattfindet (Handschin et al. 2003, Glöckner et al. 2002). Durch neuentwickelte Inkubationssysteme und Optimierung der Inkuabtionsmedien in den letzten Jahren konnte sich das In-vitro-Modell mit Präzisionsrattenleberschnitten erfolgreich in der Forschung der CYP-Induktion etablieren. Die frischen und sofort einsetzbaren Leberschnitte zeigen bis zu 72 Stunden stabile Vitalitäts- und Synthesefunktionen sowie CYP-Induzierbarkeit unter optimierten Inkubationsbedingungen (Olinga et

al. 1997, Fisher et al. 1995, Lake et al. 1996). So konnten in zahlreichen Studien unter anderem die Biotransformation von Xenobiotika als auch die CYP-Induzierbarkeit an Präzisionsleberschnitten valide untersucht werden (Gandolfi et al. 1996, Lerche-Langrand und Toutain 2000). Bei erhaltener Gewebearchitektur kann zudem bei toxischen Schäden deren Lokalisation im Lobulus erfolgen (Gandolfi et al. 1996, Smith et al. 1987). Aufgrund der genannten Eigenschaften und Vorzüge von Präzisionsleberschnitten, haben wir diese als In-vitro-Modell für die vorliegende Arbeit eingesetzt.

2.6. CYP3A-Induktion an Präzisionsleberschnitten

Die Induktion von CYP3A in vitro an Rattenleberschnitten konnte in mehreren Studien erfolgreich nachgewiesen werden. Gokhale et al. (1997) wiesen eine In-vitro-CYP3A-Induktion durch PB auf Enzymaktivitätsebene nach, wobei das Inkubationsmedium als Zusatz stets DEX (1 μ M) enthielt. Lupp et al. (2001) konnten die In-vitro-Induktion von CYP3A durch PB (100 μ M) und DEX (1 μ M) immunhistochemisch im Gewebeschnitt belegen. Glöckner et al. (2002) hatten eine CYP3A1-Expressionssteigerung auf mRNA-Ebene durch PCN an frischen und kryokonservierten Rattenleberschnitten in vergleichbarer Größenordnung nachweisen können. Mehrere andere Arbeitsgruppen berichteten ebenfalls von signifikanter Steigerung verschiedener CYP3A-mRNA (Meredith et al. 2003, Martignoni et al. 2004, Cui et al. 2005, Khan et al. 2009) oder der CYP3A-Aktivität (Martignoni et al. 2004) durch DEX und/oder PCN an Leberschnitten männlicher Ratten. Wiederum Glöckner et al. (2003) betrachteten Geschlechtsunterschiede der basalen CYP3A-Expression und deren Induzierbarkeit durch DEX. Dabei ergaben sich auf mRNA-Ebene vergleichbare Werte zwischen beiden Geschlechtern. Auf CYP-Aktivitätsebene (TH) waren in Leberschnitten von Weibchen zwar niedrigere Grundaktivitäten zu messen, dafür aber eine deutlichere Aktivitätssteigerung durch DEX als in Gewebe von Männchen zu verzeichnen. Betreffend der Altersunterschiede konnten Wauthier et al. (2004) und Lupp et al. (2008) eine bessere Induzierbarkeit durch DEX in Leberschnitten von adulten (1-3 Monate alt) als von sehr alten Tieren erkennen. Die genannten Studien wurden nicht immer unter gleichen Inkubationsbedingungen geführt, daher ist eine direkte Vergleichbarkeit eingeschränkt.

Die Übertragung der Erkenntnisse auf die „Zielspezies“ Mensch ist nicht in jedem Falle möglich (Bogaards et al. 2000). DEX vermag bei Ratten und Menschen PXR für eine Enzymsynthesesteigerung zu aktivieren (Wrighton et al. 1985, Waxman 1999, Jones et al. 2000). Rifampicin dagegen induziert CYP3A bei Ratten kaum, beim Menschen gilt es als sehr potenter Induktor für die Enzymfamilie. Um diese Speziesdifferenzen zu berücksichtigen, werden zunehmend Induktionseigenschaften an In-vitro-Modellen mit Humanleberschnitten erforscht. (Glöckner et al. 1999, Lake et al. 1997, Edwards et al. 2003, Persson et al. 2006, Khan et al. 2009). Jedoch wurden starke interindividuelle Differenzen in der basalen Expression von CYP-Isoformen und deren Ansprechen auf potentielle Induktoren beobachtet. Die große Streuung der Ergebnisse könnte signifikante Änderungen nivellieren und damit Induktionseigenschaften maskieren. Eine präzise Prädiktion der Substanzwirkung bleibt deswegen trotz Einsatz von Humanleberschnitten problematisch. Eine höhere Anzahl an Tests wäre notwendig, bei allerdings nur sehr begrenzt zur Verfügung stehendem humanem Lebermaterial. In der Literatur wurden multiple Faktoren als Ursache für die interindividuelle Variabilität der Ergebnisse diskutiert. Im Gegensatz zum Tiergewebe kann menschliches Organmaterial nicht weitgehend standardisiert vorliegen. Alters- und Geschlechtsdifferenzen der Spender sind nicht unbedeutend. Zudem bestehen meist Vorerkrankungen, Vormedikationen, individuelle Ernährungsqualitäten, Umwelteinflüsse und genetische Polymorphismen, die ein unbekanntes CYP-Expressionsmuster im Spendergewebe ergeben und auf Induktionsversuche einen wesentlichen Einfluss haben können (Gibson et al. 2002, Edwards et al. 2003, Xie et al. 2004, Tang et al. 2005). Insbesondere Tumorerkrankungen, Cytokininteraktionen bei Inflammation (Downregulation von PXR) oder intraoperativ akuter Stress können sich negativ auf die CYP-Induzierbarkeit auswirken (Fisher et al. 2001, Boroza et al. 2006, Pascussi et al. 2000). Des Weiteren ist die Methode der Materialgewinnung sehr variierend. Zum einen wird chirurgisches Resektionsmaterial, Transplantations- und Organspendegewebe, zum anderen Gewebe von Biopsien und Autopsien angewandt (Olinga et al. 1997). Verschiedene Ischämiezeiten, Aufbewahrungs- und Transportbedingungen sind unvermeidbar. Zusammenfassend wirken sich diese Gegebenheiten auf den Ausgangszustand des Lebergewebes für die Studien sehr heterogen aus und spiegeln sich in den Ergebnissen der In-vitro-Versuche wieder (Olinga et al. 1997). Für zukünftige In-

vitro-Modelle mit Humangewebe bedarf es einer umfassenden Charakterisierung des Ausgangszustandes und der Definition von Eignungskriterien je nach Fragestellung der Studie. Induktionsversuche betreffend, wurden stärkere Steigerungen von CYP-mRNA oder Enzymaktivität beobachtet, je geringer deren Basal-expression oder Aktivität ohne Induktor war (Glöckner et al. 2003, Pelkonen et al. 2008). Die Rolle des Expressionsstatus des Gewebes für Induktionen an Schnitten ist aber noch nicht ausreichend in allen Aspekten geklärt. Grundlegend müsste hierbei betrachtet werden, ob eine In-vitro-Induktion möglich und erkennbar bleibt, wenn im Spendergewebe schon in vivo Induktionsprozesse stattfanden. Es liegen bereits Arbeiten vor, in denen eine erneute In-vitro-Induzierbarkeit von CYP an Rattenleberschnitten nach vorangehender Induktion in vivo durch Einsatz derselben Substanz untersucht wurden. Eine Induktion von CYP1A1 in vivo durch BNF hatte keine relevante Auswirkung auf eine nachfolgende Induktion in vitro, da der In-vivo-Effekt von BNF bezüglich der mRNA-Expression und Enzymaktivität (ECOD) innerhalb von 24 Stunden Inkubation in Kontrollschnitten ohne BNF-Exposition ausreichend abgeklungen war (Glöckner et al. 2001, 2008). Lerch (2008) untersuchte das Induktionsverhalten von CYP2B an Leberschnitten von in vivo mit PB vorbehandelten Ratten. Der Nachweis der erneuten Induktion in vitro 24 Stunden nach In-vivo-Vorbehandlung mit PB war auf CYP-mRNA-Ebene sicher erkennbar. Die Steigerung der CYP2B-abhängigen Biotransformation (PROD) war hingegen stark vom in vivo induzierten Ausgangsniveau abhängig. Dieses war erst 72 Stunden nach Ende der Applikation von PB in vivo ausreichend abgeklungen, um einen Induktionseffekt von PB in vitro auf Aktivitätsebene nicht völlig zu maskieren. Etwas andere Ergebnisse ergaben sich bei der Induktion von CYP3A1 durch DEX. Die in vivo induzierte mRNA war in den Leberschnitten rasch abklingend, sodass nach 24 Stunden In-vitro-Inkubation mit DEX ein deutlicher Expressionsanstieg der spezifischen mRNA in Bezug zur entsprechenden Kontrollgruppe zu verzeichnen war. Die erneute Steigerung der Biotransformation (TH) war zwar abhängig vom Ausgangsniveau, aber für die 2 β - und 15 β -TH trotzdem signifikant (Lieder 2007).

Im Hinblick auf den Einsatz von Humanleberschnitten mit vorbestehendem unbekannten Enzymmuster stellt sich weiterführend die Frage, ob der bestehende Expressionsstatus oder die gleichzeitige Induktion einer weiteren CYP-Familie für die Induktion der eigentlich zu untersuchenden CYP-Familie in vitro von

Bedeutung ist. Ein dem klinischen Alltag naheliegendes Beispiel, wäre ein Raucher, der eine Cortisontherapie beginnt. Bei Rauchern ist CYP1A1 induziert. Eine CYP3A1-Induktion wäre durch die Cortisontherapie zu erwarten. Wird bei diesem Patienten die CYP3A-Induktion anders verlaufen als bei einem Nichtraucher? Könnte man Gewebeproben von Rauchern zur Untersuchung der CYP3A-Induktion in vitro einsetzen? Übertragen in den Kontext der pharmakologischen Forschung entspräche Humanmaterial von Rauchern solchem Gewebe mit vermutlich hoher CYP1A1-Aktivität, welches möglicherweise auch zum Nachweis einer CYP3A-Induktion eingesetzt werden sollte. Die Induktion von CYP1A wird u.a. über Liganden des Aryl-hydrocarbon-Rezeptors (AhR) moduliert und besitzt daher auch eine toxikologische Bedeutung. Als klassische AhR-Agonisten sind z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) oder Tetrachlordibenzodioxine (TCDD) bekannt. Im Sinne des Cross Talk sind Wechselwirkungen zwischen PXR-Liganden/CYP3A-Metaboliten und AhR vorbeschrieben (Gerbai-Chaloin et al. 2006). Shaban et al. (2005) konnten in Lebermikrosomen die Inhibition von CYP3A (mRNA und Protein) durch Aktivierung von AhR feststellen. Der Einfluss von DEX auf die In-vitro-Induktion von CYP1A1 durch dessen Modellinduktor BNF wurde 2009 von Reinhardt vorgestellt. Sowohl der CYP3A-Expressionsstatus als auch die gleichzeitige Induktion von CYP1A1 und CYP3A1 konnten weder auf Biotransformations- (EROD) noch auf mRNA-Expressionsebene die Induktion von CYP1A1 maskieren. Bei gleichzeitiger Induktion mit DEX war sogar eine bessere Induzierbarkeit von CYP1A1 durch BNF zu vermerken.

Um nun die mögliche Nutzung von Gewebe mit hoher CYP1A-Aktivität in vitro zum Nachweis von potentiellen CYP3A1 Induktoren zu überprüfen, erfolgte im Rahmen dieser Dissertation die Erforschung des Einflusses von CYP1A-induzierendem BNF auf die In-vitro-Induzierbarkeit von CYP3A1 durch dessen Modellinduktor DEX an Rattenleberschnitten. In der aktuellen Literatur sind bisher keine systematischen Versuche in dieser Kombination an Rattenleberschnitten beschrieben.

Für die Untersuchung wurde BNF den Versuchstieren 24 Stunden vor Dekapitation in vivo per os verabreicht und anschliessend deren Leberschnitte mit DEX exponiert. In zwei weiteren Versuchsserien wurden Leberschnitte unbehandelter Ratten einerseits simultan und andererseits sukzessiv mit BNF und DEX behandelt. Für die CYP1A-Induktion mit BNF in vitro wurde die Konzentration von 10 μM gewählt, da diese als sicher induzierend gilt (Gokhale et al. 1995, Glöckner et al. 2008, Reinhardt 2009). Die Inkubation mit DEX wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,01-10 μM) vorgenommen. Als Induktionsnachweis wurde die Enzymaktivität durch Bestimmung der Metabolite gemessen. Als Modellreaktion für CYP3A kann die Hydroxilierung von Testosteron zu 2 β -, 6 β - und 15 β -Hydroxytestosteron betrachtet werden (Parkinson 1996, Gebhardt et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit beschränkte sich die Bestimmung auf die 2 β - und 15 β -Testosteronhydroxylierung (TH), da hiermit die CYP3A-Aktivität und -Induzierbarkeit am besten charakterisiert werden kann (Glöckner et al. 2008). Neben der Biotransformation wurde stichprobenartig an ausgesuchten Tieren auch der CYP3A1-mRNA-Gehalt bestimmt. Mittels RT-PCR erfolgte eine semiquantitative und durch kompetitive RT-PCR eine quantitative Bestimmung der spezifischen mRNA-Expression. Zum Nachweis der BNF-bedingten CYP1A-Induktion wurde die enzyspezifische Modellreaktion der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD) bestimmt (Parkinson 1996).

3. Ziele der Arbeit

Der Einsatz von humanem Lebermaterial in vitro zur Bestimmung induzierender Eigenschaften von Verbindungen ist aufgrund der Vorbelastung der Gewebezellen in vivo mit CYP-induzierenden oder inhibierenden Fremdstoffen (z.B. Medikamente, Umweltstoffe, Ernährung) und dem daraus resultierenden unbekannten Enzymexpressionsmuster problematisch. Aufgrund von noch ex vivo möglicherweise anhaltend bestehenden In-vivo-Einflüssen sind Interaktionen denkbar, die Induktionseigenschaften von zu prüfenden Substanzen im In-vitro-Modell maskieren könnten. So liegt es nahe, Kriterien für die Verwendbarkeit von Lebergewebe für In-vitro-Modelle zur Induzierbarkeitsprüfung von CYP-Enzymen zu erarbeiten, die ggf. die vorbestehende Enzymexpression berücksichtigen. Dabei ist es aus ökonomischen, ökologischen und ethischen Gründen sinnvoll, zunächst systematische Untersuchungen an Tiergewebe durchzuführen. Gegenstand dieser Arbeit war es, Auswirkungen einer CYP1A-Induktion (erzeugt mit dem Modellinduktor BNF) auf die In-vitro-Induzierbarkeit von CYP3A durch den Modellinduktor DEX an Rattenleberschnitten zu untersuchen. Folgende grundlegenden Fragen sollten durch verschiedene Versuchsserien dabei geklärt werden:

1. Spielt eine vorangegangene CYP1A-Induktion in vivo eine Rolle für die In-vitro-Testung potentieller CYP3A1-induzierender Substanzen? Hierzu wurden Ratten in vivo mit BNF vorbehandelt und anschliessend deren Leberschnitte für 24 Stunden mit DEX inkubiert.
2. Wird eine CYP3A1-Induktion in vitro auch dann erkannt, wenn gleichzeitig CYP1A-induzierende Verbindungen in vitro einwirken? Hierzu wurden Leberschnitte unbehandelter Ratten für 24 Stunden mit DEX und BNF gleichzeitig inkubiert.
3. Ist ein möglicher Einfluss der CYP1A-Expression der Spenderleber auch durch sukzessive Einwirkung von CYP1A- und CYP3A1-Induktoren in vitro erkennbar? Leberschnitte unbehandelter Tiere wurden hierfür mit BNF 24 Stunden in vitro vorinkubiert und anschliessend einer weiteren 24-stündigen Inkubation mit DEX zugeführt. Diese Versuchsanordnung sollte klären, ob In-vitro-Vorinduktionen In-vivo-Vorbehandlungen ersetzen könnten.

Der Induktionsnachweis erfolgte hauptsächlich auf Biotransformationsebene durch die Modellreaktionen 2 β - und 15 β -TH (für CYP3A1) und EROD (für CYP1A). Zusätzlich wurde stichprobenartig an ausgesuchten Tieren der spezifische CYP3A1-mRNA-Gehalt bestimmt. Aus den Ergebnissen sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob die Verwendung von humanem Lebergewebe mit vorbestehender In-vivo-Exposition CYP1A-induzierender Agenzien für In-vitro-Induktionsversuche CYP3A1-induzierender Substanzklassen sicher möglich ist, ohne die zu untersuchenden Induktionseigenschaften zu beeinflussen. Dabei war es nicht Ziel der Arbeit die sehr komplexen molekularen Induktionsprozesse zu beschreiben, sondern zukünftige Induktionsergebnisse aus dem In-vitro-Modell „Präzisionsleberschnitt“ unter Berücksichtigung der Eigenschaften des verwendeten Spendergewebes sicherer bewerten zu können.

4. Material und Methoden

4.1. Gewinnung und Behandlung von Gewebematerial aus Versuchstieren

4.1.1. Versuchstiere

Für sämtliche Versuche wurden Lebern von 40-50 Tage alten weiblichen Wistar-Ratten (Han-WIST) verwendet, welche aus der eigenen Zucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena stammten. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $\geq 50 \pm 10\%$ und einer Beleuchtung nach Norm im 12/12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Käfige waren mit sterilisiertem Weichholzgranulat (Altromin GmbH, Lage) ausgestreut, die Tiere erhielten Standardfutter (Pellets 1326 Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser ad libitum. Die Tierversuche für die vorliegende Arbeit wurden nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes unter der Registriernummer 02-05/03 genehmigt.

4.1.2. Vorbehandlung der Tiere

Für eine Versuchsreihe wurden die Tiere einmalig mit 5 mg/100 g KG BNF (gelöst in DMSO, 0,25 ml DMSO/100 g KG) per os mittels Schlundsonde vorbehandelt und 24 Stunden später zur Gewinnung der Leber getötet. Für alle anderen Versuchsserien kamen Lebern von unbehandelten Tieren zum Einsatz.

4.1.3. Herstellung der Leberschnitte

Die Tiere wurden in Ethernarkose dekapitiert und anschließend ausgeblutet. Mit einem Ventralschnitt wurde die Leber freigelegt und zügig herauspräpariert. Dabei wurde die Magen- und Darmintegrität bewahrt, um eine Kontamination der Leber zu vermeiden. Die vollständige Leber wurde in Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) gelegt, nachdem zwei kleine Gewebestücke als Ausgangsmaterial entnommen worden waren. Die KHP-Gebrauchslösung bestand aus folgenden Zusätzen:

NaCl	120 mM
KCl	4,80 mM
KH ₂ PO ₄	1,20 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,20 mM
Na HCO ₃	25,0 mM
CaCl ₂ x 6H ₂ O	1,25 mM

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde eine Stammlösung mit Aqua bidest 1:1 verdünnt und ergänzt mit:

HEPES-Puffer	3 g/l Pufferlösung (12,6 mM)
Gentamicinsulfat	50 mg/l Pufferlösung
Ampicillin-Natrium	10 mg/l Pufferlösung

Die Gebrauchslösung wurde mit Carbogen (O₂ 95%, CO₂ 5%) begast, der pH von 7,4 mit Indikatorpapier kontrolliert.

Die zwei entnommenen Gewebestücke wurden nach Abwiegen und Überführung in Eppendorf-Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Homogenisierung bei -80°C aufbewahrt. Aus den Leberlappen wurden Gewebeyylinder mit einem Durchmesser von 8 mm manuell ausgestanzt und mit dem KRUMDIECK-Tissue Slicer (Alabama R&D Corp., Munford, AL, USA), dessen Schneidekammer mit frischem KHP gefüllt war, zu Präzisionsleberschnitten mit einer Dicke von 250 µM verarbeitet. Dieses Vorgehen hatte sich bereits in früheren Untersuchungen bewährt (z.B. Müller et al. 1998, Glöckner et al. 2008).

4.1.4. Inkubation der Leberschnitte

Als Inkubationsgefäße dienten 50-ml-Erlenmeyerkolben mit 10 ml vorgelegtem Williams Medium E (WME, Sigma Aldrich GmbH), pH 7,4, welches zuvor ergänzt wurde mit:

Gentamicinsulfat	50 mg/l
L-Glutamin	292 mg/l
Tylosintartrat	100 mg/l
Insulin (Berlinsulin H- Normal U-40 [®])	3,45 ml/l
Ampicillin-Natrium	10 mg/l

Alle Kolben erhielten sechs bis acht der angefertigten Schnitte und wurden im Schüttelwasserbad bei 37°C und Carbogenbegasung (O₂ 95%, CO₂ 5%, 10-15 l/h) inkubiert. Währenddessen wurden die Gefäße mit 100 rpm bidirektional bewegt. Das Inkubationsmedium wurde nach 2 Stunden ausgetauscht, um vom Schnitvorgang abgeschilferte Zellen oder Zelldetritus zu entfernen, welche die Vitalität des Lebergewebes negativ beeinflussen könnten (Parkinson 1996, Olinga 1997, Lerche-Langrand und Toutain 2000).

Die Inkubationszeit sowie der Zusatz an Induktoren variierten je nach Versuchsanordnung der insgesamt vier Versuchsreihen. In Abbildung 4.1. ist eine schematische Übersicht des Versuchsdesigns wiedergegeben. In allen Versuchen wurden die Leberschnitte mit Zusatz von Dexamethason (DEX, Fortecortin® Injekt 4 mg Merck) in unterschiedlichen Konzentrationen von 0,01-10 μM für stets 24 Stunden inkubiert.

In einer ersten Versuchsserie (Kontrollserie) wurde zunächst die alleinige konzentrationsabhängige Auswirkung von DEX in vitro auf die TH untersucht, da bisher nur Befunde mit Leberschnitten unbehandelter männlicher, nicht aber weiblicher Ratten vorlagen (Wagener 2005).

In einer zweiten Versuchsserie erfolgte die DEX-Exposition in vitro an Leberschnitten von Ratten, welche mit BNF vorbehandelt worden waren (24 Stunden vor Dekapitation).

In zwei weiteren Versuchsserien wurden schließlich beide Induktoren in vitro eingesetzt. Dazu wurde BNF in DMSO gelöst und mit einer Endkonzentration von 10 μM verwendet, da sich diese Konzentration unter den gegebenen Bedingungen als sicher induzierend für CYP1A erwiesen hatte (Glöckner et al. 2005, 2008). Die DMSO-Konzentration betrug im Inkubationsmedium 0,2%. In der dritten Versuchsserie wurden die Leberschnitte DEX und BNF gleichzeitig exponiert. Die vierte Versuchsvariante bestand aus einer 24-stündigen Vorinkubation mit BNF vor Exposition mit DEX.

Bei allen Versuchsserien wurden Kontrollgruppen ohne Zusatz und gegebenenfalls Lösungsmittelkontrollen (DMSO 0,2%) mitgeführt. Jede Versuchsgruppe wurde doppelt angesetzt. Pro Serie betrug die Anzahl an Versuchstieren zumeist $n=5-6$.

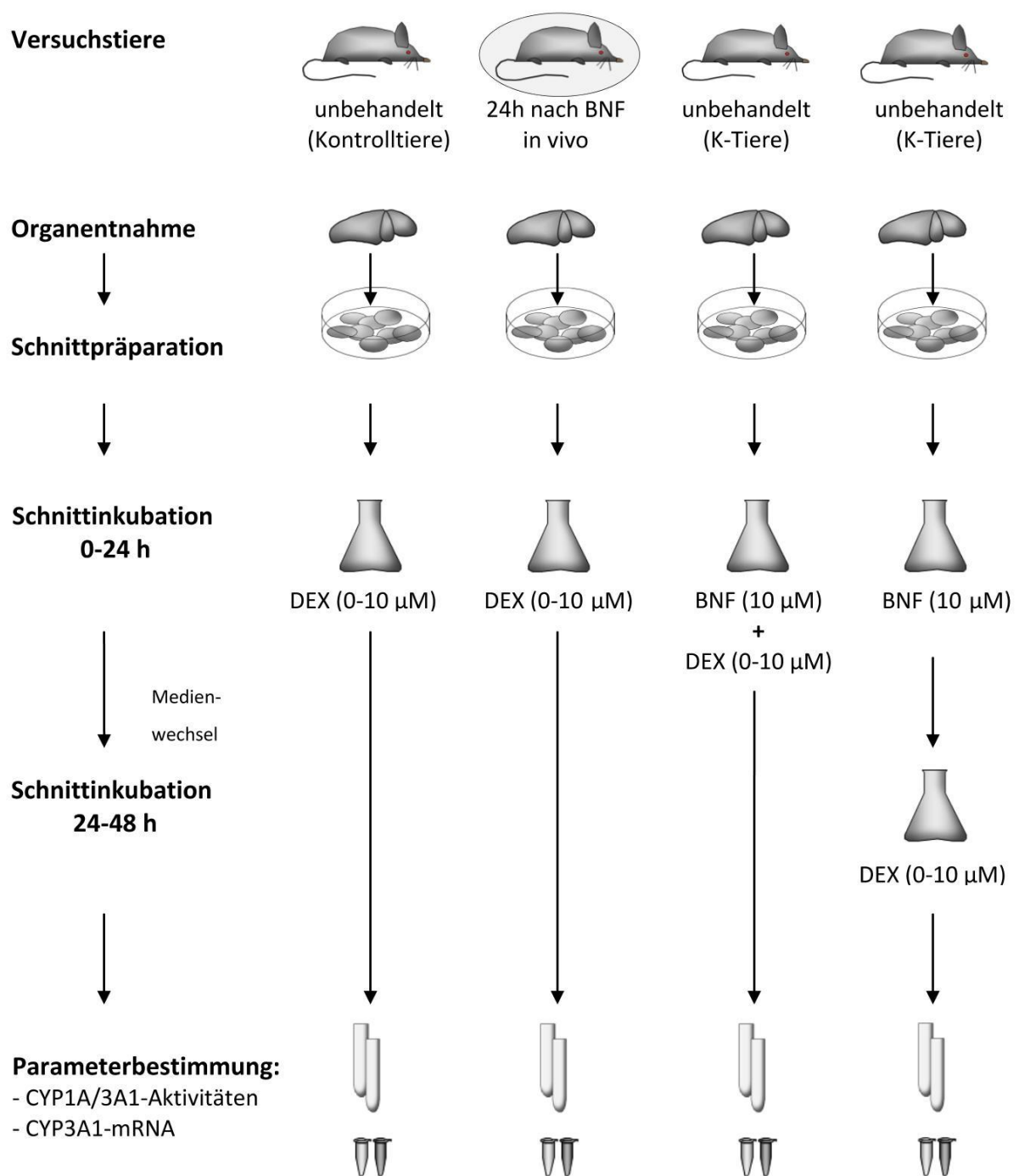


Abbildung 4.1.: Versuchsdesign. Zusätzlich zur Angabe im Schema erfolgte die Bestimmung der CYP-Aktivitäten (EROD und TH) als auch die CYP3A1-mRNA-Bestimmung ausserdem im Lebergewebe vor der Schnittpräparation und bei den Versuchen über 48 Stunden auch nach dem Medienwechsel.

4.1.5. Homogenisation der Leberschnitte

Die Präzisionsleberschnitte wurden nach der Inkubation auf Filterpapier trocken getupft und abgewogen. Jeweils zwei intakte Schnitte einer Gruppe wurden für die RT-PCR separiert, das restliche Gewebematerial (Pool aus 12 Schnitten) entsprechend dem Gewicht 1:30 (ein Teil Leber, 29 Teile Puffer) mit eisgekühltem 0,1 M Na_2PO_4 -Puffer (pH 7,4) mittels POTTER-ELVEJHEM-Homogenisator mechanisch homogenisiert. Die Homogenate und die für die RT-PCR vorgesehenen Leberschnitte wurden unmittelbar mittels flüssigem N_2 tiefgefroren und bis zur weiteren Bestimmung bei -80°C gelagert.

4.2. Bestimmungsmethoden der Biotransformationsaktivität

4.2.1. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration [mg Protein/ml Homogenat] diene als Bezugsgröße für die Biotransformationsaktivitäten. Zur Bestimmung in Schnitthomogenat wurde die Biuret-Methode, modifiziert nach Klinger und Müller (1974), angewandt.

Die Proteinermittlung wurde als Doppelbestimmung mit 2 Messansätzen je Probe durchgeführt. Um Messfehler zu reduzieren, wurden neben den Hauptwerten die Trübungswerte der jeweiligen Proben bestimmt und bei der Messung Probenleerwerte und Trübungsleerwerte einkalkuliert. Folgende Ansätze ergaben sich für die Reaktion:

<u>Hauptwert:</u>	Homogenat	0,15 ml
	Natriumdesoxycholat (10%)	0,05 ml
	Biuretreagenz	0,80 ml
<u>Biuretleerwert:</u>	Na_2PO_4 -Puffer (0,1 M)	0,15 ml
	Natriumdesoxycholat (10%)	0,05 ml
	Biuretreagenz	0,80 ml
<u>Trübungswert:</u>	Homogenat	0,15 ml
	Natriumdesoxycholat (10%)	0,05 ml
	NaOH (3%)	0,80 ml

<u>Trübungsleerwert:</u>	Na ₂ PO ₄ -Puffer (0,1 M)	0,15 ml
	Natriumdesoxycholat (10%)	0,05 ml
	NaOH (3%)	0,80 ml

Nach Zugabe von Natriumdesoxycholat (10%) wurden die Proben geschüttelt und 5 min inkubiert, bevor Biuretreagenz oder NaOH (3%) folgten. Die Reaktionsansätze wurden abschließend mittels Vortexer durchmischt. Nach 30 min Reaktionszeit konnte die Extinktion am Simultan-Spektralphotometer SPEKOL (Carl-Zeiss-Jena) bei 546 nm Wellenlänge gemessen werden. Der Eichfaktor der Biuretreaktionslösung zur Eiweißmessung wurde mit Rinderserumalbumin bestimmt.

4.2.2. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

Diese Modellreaktion charakterisiert besonders die Aktivität des BNF-induzierbaren CYP1A1, da sie relativ spezifisch von diesem Enzym abhängt (Parkinson 1996). Sie wurde hier zum Nachweis der BNF-Wirkung eingesetzt. Die Bestimmung der kofaktorabhängigen Reaktion wurde in Anlehnung an Pohl und Fouts (1980), modifiziert nach Müller (1990) durchgeführt. Bei dieser Deethylierung entsteht Resorufin, dessen ausgezeichnete Fluoreszenz geringste Mengen zu detektieren erlaubt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte am Leberhomogenat, wobei alle Gruppen der Versuchsreihen als Doppelbestimmung geführt wurden.

Zunächst wurden in jedes Reagenzglas 100 µl Ethoxyresorufin pipettiert und dessen Lösemittel Methanol im Wasserbad bei 95°C verdampft, um im Reaktionsansatz von 0,5 ml eine Substratkonzentration von 2 µM zu erhalten. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 4.1. angegeben. Die Leerwerte enthielten alle Substanzen, jedoch statt des Homogenats die äquivalente Menge an Puffer. Die EROD wurde mit der Zugabe von 100 µl NADPH (0,25 µmol/0,1 ml) gestartet. Nach 5 min Reaktionszeit unter Schütteln bei 37°C wurde die Bio-transformation mit geeistem Methanol gestoppt und die Proben sofort in ein Eisbad gestellt. Alle Röhrchen wurden mit 4500 U/min zentrifugiert, bevor die Resorufinfluoreszenz bei 540 nm Exzitations- und 585 nm Emissionswellenlänge mit dem Photometer F 2000 (HITACHI) erfasst wurde. Vor jeder Messreihe war eine Kalibrierkurve mit Resorufin zu erstellen. Der Umsatz wurde in [pmol Resorufin x min⁻¹ x mg Protein⁻¹] berechnet.

Tabelle 4.1.: Reaktionsansätze für EROD und TH.

Zusatz	Konzentration	EROD-Ansatz	TH- Ansatz
G-6-PNa ₂	25 mM	100 µl	200 µl
MgCl ₂	100 mM	100 µl	200 µl
NaPO ₄	0,1 M	150 µl	200 µl
Homogenat		50 µl	200 µl
NADPH	2,5 mM	100 µl	200 µl

4.2.3. Testosteronhydroxylierung (TH)

Die Aktivität wurde am Leberhomogenat für jede Gruppe doppelt bestimmt. Der Reaktionsansatz ist ebenfalls in Tabelle 4.1. ersichtlich. Als Substrat wurde Testosteron 0,5 mM pro Reaktionsansatz zugesetzt. Die Leerwerte enthielten statt des Homogenats die äquivalente Menge an Phosphatpuffer. Die Proben wurden gemischt und im Wasserbad für 2 min bei 37°C temperiert. Die weitere Durchführung der TH-Reaktion erfolgte wie bei Glöckner et al. (2008) beschrieben. Nach der 10-minütigen TH-Reaktion wurden die Proben bis zur Festphasenextraktion lichtgeschützt bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt. Die aufgetauten Proben wurden gut geschüttelt, bei 4500 U/min für 15 min zentrifugiert und der Festphasenextraktion mit STRATA-X Säulen zugeführt. Diese wurden unter konstantem Vakuumsog mit den Proben beladen und anschließend mit 5%igem Methanol gewaschen. Die Testosteronhydroxide wurden mit 2 x 2 ml Methanol eluiert und das Eluat bei 50°C unter Stickstoffbegasung bis zur Trockne eingengt. Die Messung erfolgte mittels der HPLC (high pressure liquid chromatographie) nach Lösen der Metaboliten in der mobilen Phase (H₂O 65,7%, Methanol 27,3%, Tetrahydrofuran 7%). Eichkurven für jeden interessierenden Metaboliten wurden als Grundlage für die Berechnung mitgeführt. Für die Aktivitätsbestimmung des CYP3A1 sind u.a. 2β- und 15β-Hydroxytestosteron spezifisch (Parkinson 1996). Deshalb wurde die Auswertung in dieser Arbeit auf diese beiden Metaboliten beschränkt.

4.3. Bestimmung der CYP3A1-mRNA

4.3.1. RNA-Isolierung aus Gewebematerial

Für die RNA-Isolierung wurde der RNA Kit II von Invisorb[®] entsprechend der Herstellervorschrift eingesetzt. Die eingefrorenen Schnitte (Masse ≤ 50 mg) wurden mit Lysis-Solution und einem Pistill homogenisiert, anschließend zentrifugiert, um den Bodensatz zu entfernen. Mit den Arbeitsschritten der Adsorbinzugabe, Phenolextraktion, Präzipitation und Waschung konnten Pellets gewonnen werden, welche die RNA enthielten. Die Pellets wurden in einem weiteren Schritt in NFW (Nuclease Free Water) aufgelöst.

Die Messung der Konzentration an Gesamt-RNA in den Proben erfolgte am UNICAM-Spektrometer. Nukleinsäuren haben aufgrund ihrer Basenstruktur ein Absorptionsmaximum bei 260 nm Wellenlänge, Proteine dagegen bei 280 nm. Ein Quotient aus beiden Absorptionswerten kann zur Beurteilung der Reinheit der Nukleinsäurelösung herangezogen werden. Der Quotient $Q = A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ sollte zwischen 1,9 und 2,2 liegen. Werte unter 1,9 weisen auf einen höheren Gehalt an Proteinen in den Proben, wobei ein größeres Augenmerk auf die Ähnlichkeit der Quotienten innerhalb der verschiedenen Proben gelegt werden sollte (Gause und Adamovicz 1995, Connolly et al. 2003). Die isolierte Gesamt-RNA wurde bis zur RT-PCR bei -80°C gelagert.

4.3.2. Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine In-vitro-Methode, die eine Amplifizierung und Analyse von geringsten Mengen spezifischer RNA, hier CYP3A1-mRNA, ermöglicht (Rappolee et al. 1988). Sie ist als Nachweismethode und zur Quantifizierung von exprimierter mRNA sehr sensitiv (Wang und Brown 1999) und für das Charakterisieren und Vergleichen des Expressionsmusters und Levels innerhalb der verschiedenen Proben gut geeignet (Bustin 2000).

Das klassische Verfahren der Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde von Mullis et al. 1986 etabliert und besteht aus einer enzymatischen Vermehrung von DNA. Die Vermehrung von RNA ist möglich, wenn diese in einem der PCR vorgeschaltete Prozess, sog. Reversen Transkription (RT), in ihre komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Die RT-PCR führt lediglich zur Vermehrung spezifischer RNA-Sequenzen und zur semiquantitativen Mengenbe-

stimmung. Eine quantitative Aussage über den ursprünglichen RNA-Gehalt ist erst durch die kompetitive RT-PCR möglich. Hierzu wird dem RT Ansatz neben der Proben-RNA ein interner Standard (synthetisches Mimik-Fragment der Proben-RNA als Eich-RNA) in verschiedenen bekannten Konzentrationen zugesetzt. Durch Konkurrenz wird je nach Konzentrationsverhältnis die Proben-RNA entweder in geringerer, gleicher oder höherer Anzahl als die Eich-RNA amplifiziert. Bei gleicher Anzahl spricht man vom Äquivalenzpunkt, der eine Kalkulation der Proben-RNA-Menge erlaubt. Um den Äquivalenzpunkt (identische Konzentrationen von RT-PCR-Produkten der Proben-RNA und Eich-RNA) ermitteln zu können, wurde bei dieser Arbeit die kompetitive RT-PCR für jede Probe mit acht verschiedenen Konzentrationen an Eich-RNA durchgeführt. Um Kontaminationen ausschließen zu können, wurden Negativkontrollen mitgeführt.

In dieser Arbeit wurden von allen Versuchsserien stichprobenartig alle Versuchsgruppen von meist zwei Tieren mittels konventioneller RT-PCR semiquantitativ untersucht, danach für ausgewählte Gruppen eine kompetitive RT-PCR durchgeführt. Zum Einsatz kamen folgende Oligonucleotidprimer der Firma MWG-BIO-TECH AG (Gebrauchslösung 20 µmol/l NFW; Basenpaarproduktgröße 290 bp):

- CYP3A1 FW-Primer: 5'GAT GTT GAA ATC AAT GGT GTG T-3'
- CYP3A1 REV-Primer: 5'TTC AGA GGT ATC TGT GTT TCC 3'

Der Ansatz (RT-Master-MIX) der kompetitiven RT für eine einzelne RNA-Probe bestand aus:

NFW	4,05 µl
Reverse Transcription 10x Buffer	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
CYP3A1 REV-Primer (20 mM)	0,5 µl
RNAsin	0,2 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,15 µl
Template RNA (einer Probe)	0,1 µl
Eich-RNA (222 bp)*	1 µl
<i>*bei nicht kompetitiver RT ersetzt durch NFW</i>	

Die RT erfolgte im Mastercycler. Dabei wurden die Proben zu je 12 min auf 42, 45 und 48°C temperiert, sodass die reverse Transkription nach einem Zyklus mit 36 min abgeschlossen war. Die RT-Produkte konnten bei -20°C eingefroren oder gleich der PCR zugeführt werden.

Folgende Komponenten wurden für die PCR einer einzelnen RT Probe zusammen gegeben:

NFW	18,7 µl
10 x taq Reaction Buffer incl. MgCl ₂ (15 mM)	2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
CYP3A1 FW-Primer (20 mM)	1 µl
CYP3A1 REV-Primer (20 mM)	1 µl
Recombinant Taq DNA-Polymerase	0,3 µl
RT-Produkt (cDNA)	1 µl

Im Mastercycler (mit vorgeheiztem Deckel, 103°C) wurde die PCR gemäß folgendem Programm durchgeführt:

1. T = 94 °C, 3 min (Aufschmelzen)
2. T = 94 °C, 20 s (Aufschmelzen)
3. T = 54 °C, 20 s (Annealing)
4. T = 72 °C, 45 s (Extention)
5. GO TO 2, REP 34
6. T = 72 °C, 1 min 30s (Komplettierung)

Nach insgesamt 35 Zyklen der Schritte 2-4 wurde die PCR mit Programmpunkt 6 beendet.

Die Ergebnisse der RT-PCR konnten mit der Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden (s. Abb. 4.2. und 4.3.). Die DNA-Fragmente lassen sich aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen gelelektrophoretisch trennen, wobei die Wandergeschwindigkeit der Nukleinsäuren unter anderem von der Molekülgröße und der angelegten Spannung abhängt.

Für die Versuche wurde 2%iges Agarose-Gel verwendet. Hierzu wurden 2 g Agarose mit 100 ml 1xElektrophoresepuffer versetzt und in der Mikrowelle auf-

gekocht. Um die genaue Position der DNA Fragmente im Gel lokalisieren zu können, wurden 50 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (0,1%ige Lösung) dem noch flüssigen Gel zugerührt und eine klare Gelplatte gegossen. Jeweils 10 µl der mit Blaumarker versetzten Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Während des Trennverfahrens interkalierte Ethidiumbromid mit den Basenpaaren der Nukleinsäuren und ließ deren Position im Anschluss durch Fluoreszenz bei UV-Licht sichtbar werden. Über stets mitgeführte 50 bp DNA-Leiter konnte die Größenzuordnung und damit eine Identifikation der gesuchten RT-PCR-Produkte erfolgen. Die Fluoreszenzen der Laufbanden wurden mit dem PC-Programm LISCAP dokumentiert und konnten nun ausgewertet werden. Dabei wurden die Signale der PCR-Produkte der Ziel-RNA (290 bp) mit denen der Eich-RNA-Verdünnungen (222 bp) verglichen. Die Bestimmung der Banden äquivalenter Fluoreszenz ermöglichte eine Berechnung mutmaßlich konstitutiv exprimierter bzw. induzierter CYP3A1-mRNA [mol/µg RNA].

Die nachstehenden Abbildungen 4.2. und 4.3. präsentieren Beispiele gelelektrophoretisch getrennter RT-PCR- und kompetitiver RT-PCR-Produkte isolierter Gesamt-RNA aus Präzisionsleberschnitten nach Inkubation mit verschiedenen DEX-Konzentrationen für 24 Stunden. In Abb. 4.2. lassen sich nach RT-PCR semiquantitativ die Mengen generierter CYP3A1-mRNA (290 bp) erkennen, wogegen in Abb. 4.3. mit Hilfe der kompetitierenden Eich-RNA (222 bp) die Äquivalenzpunktbestimmung (Pfeil) einer ausgesuchten Probe nach kompetitiver RT-PCR dargestellt ist, die die Quantifizierung ermöglicht.

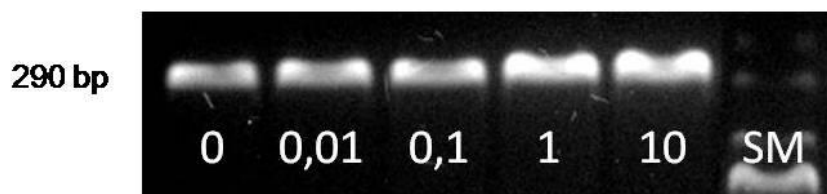


Abbildung 4.2.: Beispiel einer Gelelektrophorese der RT-PCR-Produkte (290 bp) generiert aus CYP3A1-mRNA. Die mitgeführte DNA-Leiter ermöglicht eine Größenbestimmung der Nucleinsäuren. In den Banden sind die Mengen an generierter CYP3A1-mRNA semiquantitativ anhand der Bandenstärke zu erkennen. DEX-Konzentration [µM] als Zahl unter den Banden; **SM:** Size-Marker (50 bp DNA-Leiter).

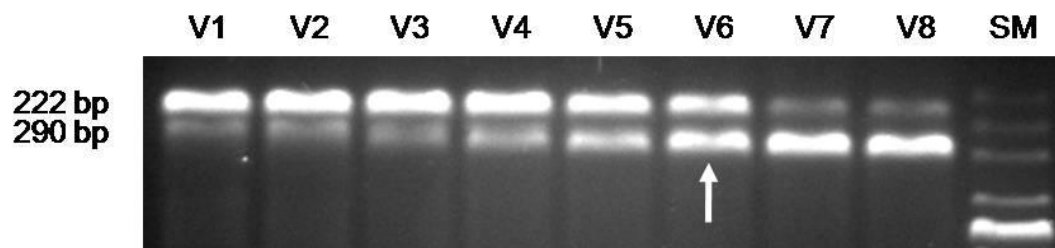


Abbildung 4.3.: Beispiel einer Gelelektrophorese nach kompetitiver RT-PCR isolierter RNA einer Probe. Der Vergleich der Fluoreszenz der generierten RT-PCR-Produkte aus Proben-RNA (290 bp) und verschiedenen Verdünnungen (V1-8) der Eich-RNA (222 bp) ermöglicht die Bestimmung des Äquivalenzpunktes (↑) und daraus die Berechnung des Gehaltes von CYP3A1-mRNA in der untersuchten Probe. **SM:** Size-Marker (50 bp DNA-Leiter); **V1-8:** kompetitive RT-PCR mit zunehmender Verdünnung der Eich-RNA (geometrische Verdünnungsreihe).

4.4. Statistik

Die Biotransformationsaktivitäten der einzelnen Versuchsserien mit unabhängigen Schnittpräparationen wurden als arithmetische Mittel und deren Standardfehler zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und induzierten Gruppen (aus denselben Lebern stammend) wurden mit dem Studentschen t-Test für gepaarte Beobachtungen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ auf deren Signifikanz geprüft.

5. Ergebnisse

5.1. CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX an Leberschnitten unbehandelter Ratten

Die Inkubation von Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten mit DEX in verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der CYP3A1-abhängigen 2 β - und 15 β -TH (Abb. 5.1.). Signifikante Unterschiede der Biotransformationsaktivitäten gegenüber der Kontrollgruppe ohne Zusatz waren ab einer Konzentration von 0,5 μ M DEX für beide Reaktionen zu verzeichnen. Dabei wurde die 2 β -TH mit 1 μ M DEX ca. 17-fach und mit 10 μ M DEX ca. 30-fach gesteigert. Die Induktion der 15 β -TH lag mit den Faktoren 7 (1 μ M DEX) und 24 (10 μ M DEX) in der gleichen Größenordnung. Das Aktivitätsniveau (Absolutwerte) war unter den einzelnen Tieren der Versuchsserie stark unterschiedlich, die Induktion (relative Steigerung) erfolgte jedoch im gleichen Ausmaß. Für diese Versuchsserie wurde keine Bestimmung der mRNA für CYP3A1 durchgeführt.

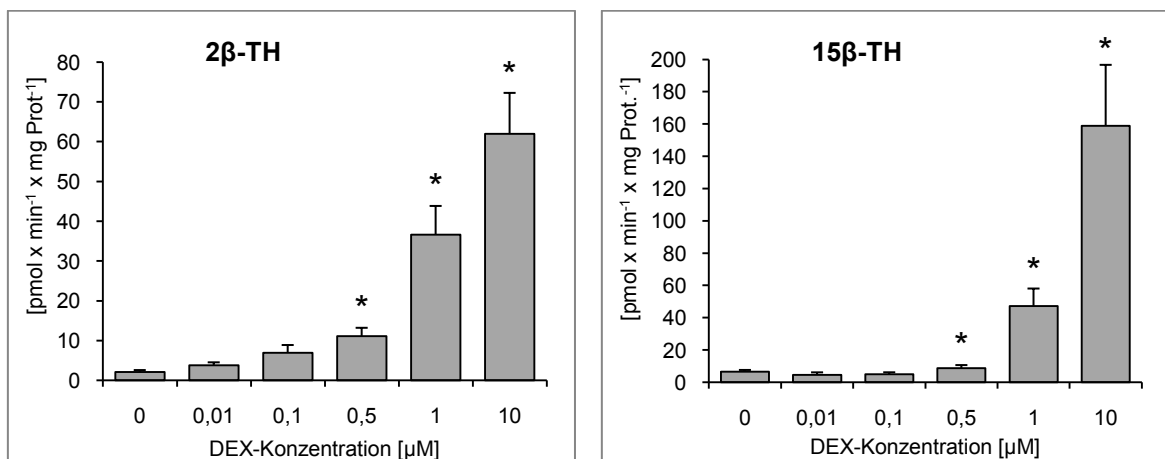


Abbildung 5.1.: CYP3A1-abhängige 2 β - (links) und 15 β -TH (rechts) in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX (0,01 - 10 μ M).

0 = Kontrollschnitte ohne Zusatz; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, n = 5-11; * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$); Aktivität in Lebergewebe vor der Schnittpreparation: 9 ± 3 (2 β -TH) bzw. 19 ± 2 (15 β -TH) $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$.

In den folgenden Abschnitten wurde der Einfluss von BNF in vivo und in vitro auf die Induzierbarkeit von CYP3A1 durch dessen Modellinduktor DEX untersucht. Hierbei wird zunächst die BNF-Wirkung anhand der EROD gezeigt, anschliessend die DEX-induzierte Aktivität der CYP3A1 beschrieben und abschliessend die Induktion für CYP3A1 auf mRNA-Ebene betrachtet.

5.2. CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX an Leberschnitten BNF-vorbehandelter Ratten

5.2.1. Nachweis des In-vivo-Effekts von BNF (EROD)

Die CYP1A-induzierende Eigenschaft von BNF nach in vivo Gabe konnte mit der EROD überprüft werden (Abb. 5.2.). Nach einer initial stark erhöhten CYP1A-Aktivität im Lebergewebe vor der Schnittpräparation (horizontale Linie in der Abbildung) war diese in vitro nach 24 Stunden Schnittinkubation in allen Gruppen wieder deutlich reduziert, wobei sie immer noch viel höher lag als in inkubierten Leberschnitten un behandelter Tiere (vgl. Abb. 5.5. und 5.8.). Dies entspricht den Erfahrungen früherer Untersuchungen mit Leberschnitten männlicher Ratten, in denen gezeigt werden konnte, dass der In-vivo-Effekt von BNF auf CYP1A1 relativ schnell in vitro abklingt (Glöckner et al. 2001). Der Rückgang der Induktion ist nicht als mangelnde Qualität der Schnitte zu werten, da andere Funktionen voll erhalten blieben. Aus Abb. 5.2. wird als Nebenfund sichtbar, dass die EROD-Induktion in Gegenwart von höheren DEX-Konzentrationen (ab 1 μM) etwas langsamer abzuklingen schien.

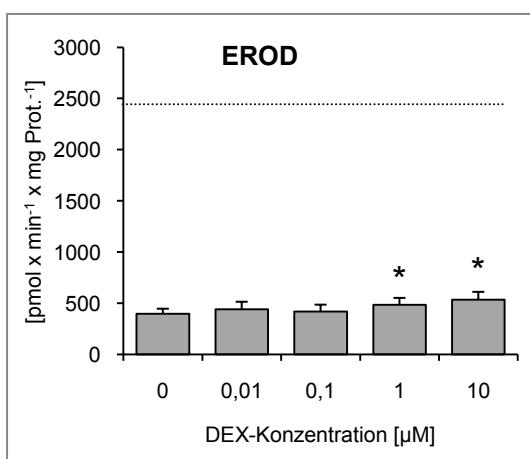


Abbildung 5.2.: CYP1A-abhängige EROD in Leberschnitten BNF-vorbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX in vitro. **0** = Kontrollschnitte ohne Zusatz; **horizontale Linie** = mittlere EROD-Aktivität in Lebergewebe vor der Schnittpräparation ($2425 \pm 251 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$); Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, $n = 6$; * = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

5.2.2. Die CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX

5.2.2.1. CYP3A1-Aktivität (2 β - und 15 β -TH)

Auch nach Vorbehandlung weiblicher Ratten in vivo mit BNF ließ sich nach einer 24-stündigen In-vitro-Exposition der Leberschnitte mit DEX eine konzentrationsabhängige Steigerung der 2 β - und 15 β -TH erkennen (Abb. 5.3.). Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe ohne Zusatz zeigen sich bei DEX-Konzentrationen ab 1 μ M. Im Vergleich zu den Leberschnitten unbehandelter Ratten (s. 5.1.) waren die Aktivitäten und Induktionsfaktoren etwas kleiner (8- bzw. 10-fache Steigerung durch 10 μ M DEX). Die konzentrationsabhängige Induktion war aufgrund der zuvor verminderten Aktivität im Lebergewebe vor der Schnittpräparation (bei beiden TH-Derivaten $5 \pm 0,9$ pmol x min⁻¹ x mg Prot.⁻¹) trotzdem sicher erkennbar.

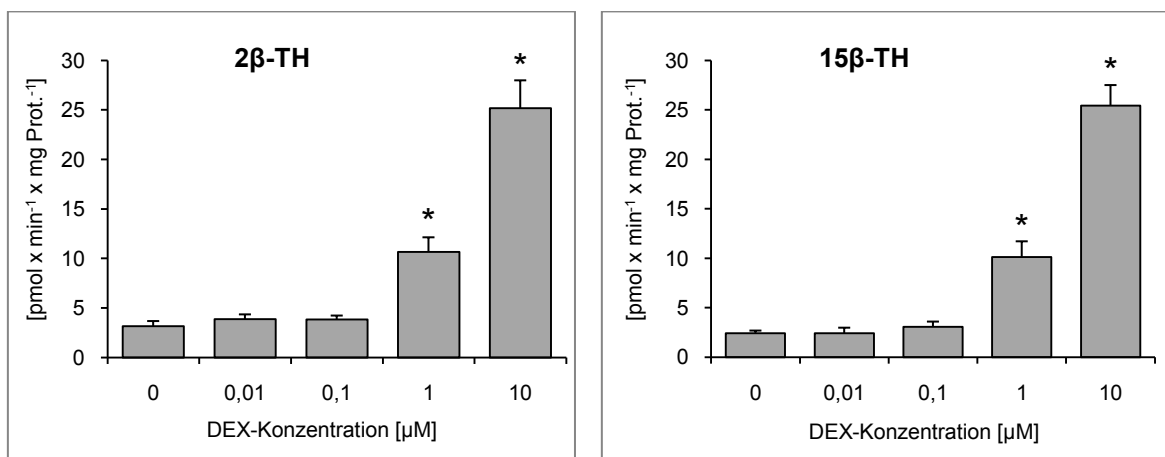


Abbildung 5.3.: CYP3A1-abhängige 2 β - (links) und 15 β -TH (rechts) in Leberschnitten BNF-vorbehandelter Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX in vitro.

0 = Kontrollschnitte ohne Zusatz; Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, n = 6; * = signifikanter Unterschied zu Kontrollschnitten (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$); Aktivitäten in Lebergewebe vor der Schnittpräparation für 2 β - und 15 β -TH = $5 \pm 0,9$ pmol x min⁻¹ x mg Prot.⁻¹

5.2.2.2. CYP3A1-mRNA-Expression

In dieser Versuchsserie wurde die Induktion von CYP3A1 auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR an drei Tieren untersucht. In der Teilabbildung 5.4. (oben) ist die semiquantitative Bestimmung der spezifischen mRNA aller Gruppen eines Tieres nach Gelelektrophorese als Beispiel demonstriert. Mit zunehmender DEX-Konzentration (ab 1 μM) wurde eine verstärkte Fluoreszenz der Banden sichtbar, somit ist auch auf mRNA-Ebene der CYP3A1-induzierende Effekt von DEX erkennbar. Ausgesuchte Gruppen wurden anschließend einer kompetitiven RT-PCR zugeführt und der CYP3A1-mRNA-Gehalt quantifiziert. Die Einzelwerte der Tiere sind in der Teilabbildung 5.4. (unten) dargestellt. Das Expressionsniveau zeigte auch hier eine gewisse interindividuelle Variabilität. Im Mittel betrug es in der Kontrollgruppe $22 \pm 12 \text{ mol}/\mu\text{g RNA} \times 10^{-17}$ und in den induzierten Gruppen 316 ± 94 (1 μM DEX) bzw. $618 \pm 61 \text{ mol}/\mu\text{g RNA} \times 10^{-17}$ (10 μM DEX), wodurch gegenüber der Kontrollgruppe ohne Zusatz eine Expressionssteigerung auf das 14-fache (1 μM DEX) bzw. 28-fache (10 μM DEX) gemessen wurde.

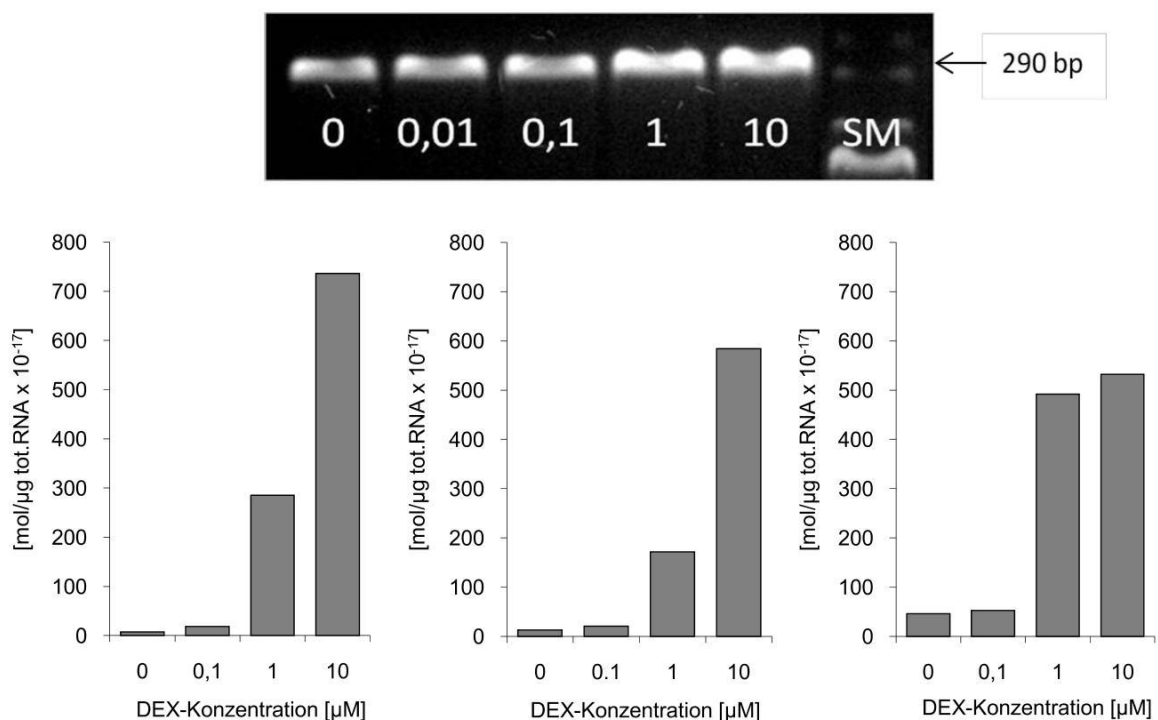


Abbildung 5.4.: CYP3A1-mRNA in Leberschnitten BNF-vorbehandelter weiblicher Ratten nach 24-stündiger DEX-Exposition (0,01-10 μM) in vitro.

Oben: Gelelektrophorese der spezifischen RT-PCR Produkte (290 bp) aller Gruppen eines Tieres; DEX-Konzentration [μM] als Zahl unter den Banden; **SM** = Size-Marker; **0** = Kontrollschnitte ohne Zusatz. **Unten:** Quantifizierung der spezifischen mRNA ausgesuchter Gruppen mittels kompetitiver RT-PCR; Darstellung der Einzelwerte dreier Tiere.

5.3. Einfluss von BNF in vitro auf die CYP3A1-Induktion durch DEX an Leberschnitten unbehandelter Ratten

In den nachfolgenden Versuchsserien wurde der Einfluss von BNF in vitro auf die Induktion von CYP3A1 durch DEX betrachtet. Dabei wurden einerseits die Effekte einer simultanen und andererseits einer sukzessiven Inkubation mit BNF und DEX untersucht.

5.3.1. DEX-Exposition in vitro gleichzeitig mit BNF

5.3.1.1. Nachweis des In-vitro-Effekts von BNF (EROD)

Bei der Untersuchung der BNF-Wirkung auf die CYP1A-Aktivität konnte in allen BNF-exponierten Gruppen ein eindeutiger Induktionseffekt festgestellt werden (Abb. 5.5.). BNF steigerte die EROD umso stärker, je höher die DEX-Konzentration im Inkubationsmedium war, obwohl DEX allein zu keinerlei Aktivitätssteigerung führte. Im Vergleich zu den Werten nach einer Exposition mit BNF allein konnte mit Zusatz von 10 μM DEX im Mittel eine 4-fach höhere EROD-Aktivität erreicht werden.

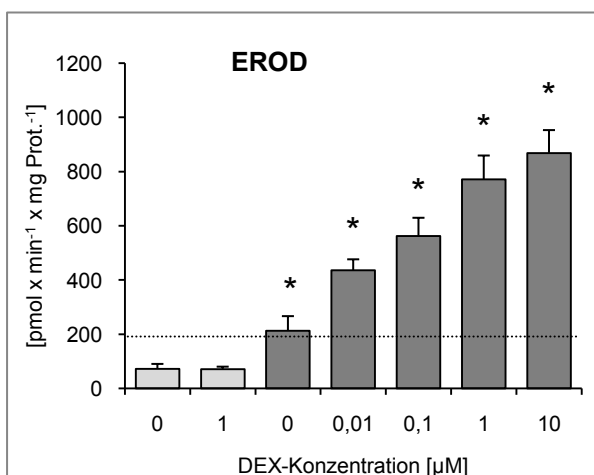


Abbildung 5.5.: CYP1A-abhängige EROD-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX (0-10 μM) und BNF 10 μM (gelöst in DMSO).

Helle Säulen: Gruppen ohne BNF, statt dessen DMSO 0,2%; **dunkle Säulen:** Gruppen mit BNF 10 μM . **Horizontale Linie** = Aktivität in Lebergewebe vor der Schnittpräparation: $186 \pm 40 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$. Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, $n = 5$; * = signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

5.3.1.2. Die CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX

5.3.1.2.1. CYP3A1-Aktivität (2 β - und 15 β -TH)

Die Induktion der CYP3A1-Aktivität durch DEX in vitro war unter Einfluss von BNF ungestört (Abb. 5.6.). DEX führte nach 24 Stunden erwartet zu einer konzentrationsabhängigen Aktivitätssteigerung der 2 β - und 15 β -TH. Die Induktionsfaktoren lagen für DEX 1 μ M in Gegenwart von BNF bei 4-5 und entsprachen den Werten bei Inkubation mit DEX 1 μ M allein. Unter DEX 10 μ M wurde gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe im Mittel eine Aktivitätssteigerung auf das 14- (2 β -TH) bzw. 11-fache (15 β -TH) erreicht.

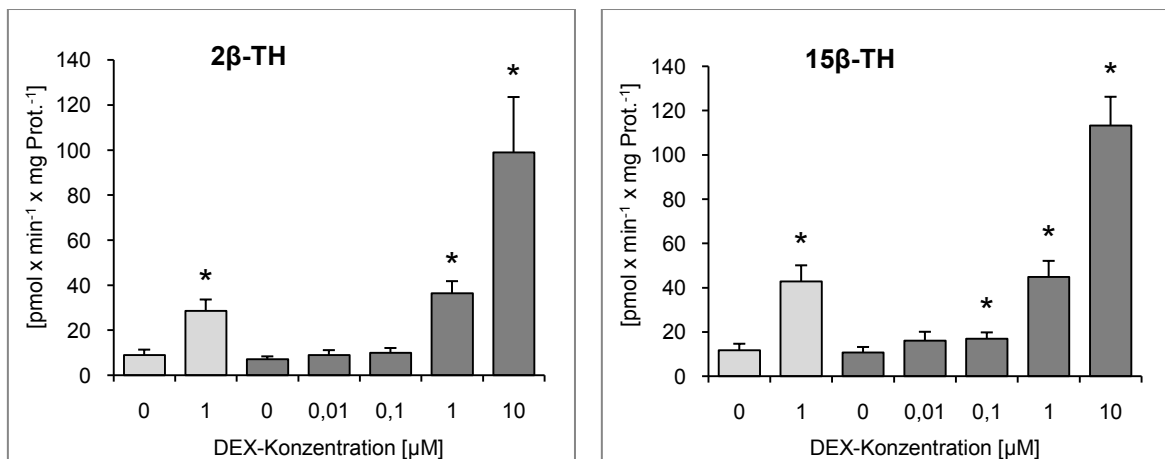


Abbildung 5.6.: CYP3A1-abhängige 2 β - (links) und 15 β -TH (rechts) in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX (0-10 μ M) und BNF 10 μ M (gelöst in DMSO).

Helle Säulen: Gruppen ohne BNF, stattdessen mit DMSO 0,2%; **dunkle Säulen:** Gruppen mit BNF; Aktivität in Lebergewebe vor der Schnittpräparation: 15 \pm 2,8 (2 β -TH) und 17 \pm 3,7 (15 β -TH) pmol x min⁻¹ x mg Prot.⁻¹. Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, n = 5; * = signifikanter Unterschied zur zugehörigen Gruppe ohne DEX (gepaarter t-Test, p \leq 0,05).

5.3.1.2.2. CYP3A1-mRNA-Expression

In der semiquantitativen Darstellung der Proben zweier Tiere nach RT-PCR und Gelelektrophorese der exprimierten CYP3A1-mRNA konnten korrelierend zur 2 β - und 15 β -TH stärkere Banden bei Gruppen höherer DEX-Konzentration beobachtet werden (Beispiel eines Tieres s. Abb. 5.7. oben). Der ermittelte CYP3A1-mRNA-Gehalt der Stichproben nach Durchführen der kompetitiven RT-PCR ist aus Abb. 5.7. unten ersichtlich. Bei beiden Tieren konnten praktisch identische Induktionsfaktoren bestimmt werden. DEX 1 μ M mit BNF führt zur 33- bzw. 40-fachen Expressionssteigerung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Hier fand sich kein wesentlicher Unterschied zur Inkubation mit DEX 1 μ M allein, welches die Expression auf das 30- bzw. 34-fache steigerte. Damit zeigte sich auch auf mRNA-Ebene die uneingeschränkte In-vitro-Induktion von CYP3A1 durch DEX in Gegenwart von BNF trotz zeitgleicher CYP1A-Induktion. Die BNF-Gruppe ohne DEX (BNF-Kontrolle) wies einen ähnlichen Gehalt an spezifischer CYP3A1-mRNA vor wie die Kontrollgruppe mit DMSO. Demnach hatte BNF allein keinen relevanten Einfluss auf die Expression dieser spezifischen mRNA.

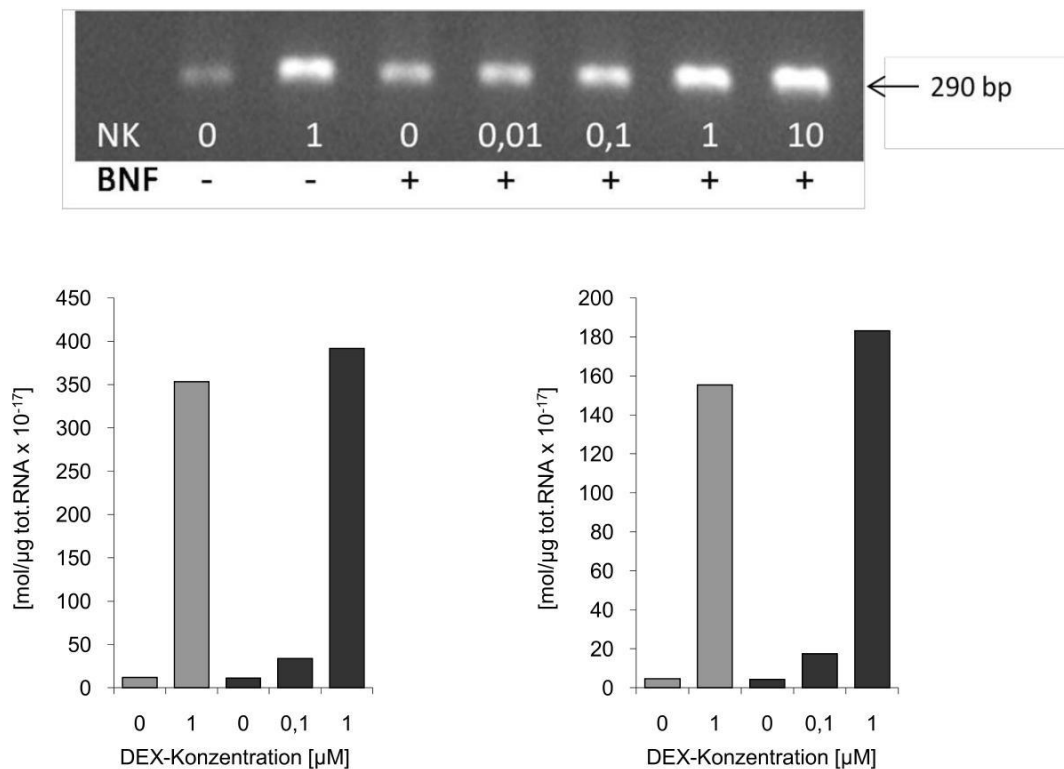


Abbildung 5.7.: CYP3A1-mRNA in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX (0,01-10 µM) und BNF 10 µM (gelöst in DMSO) gleichzeitig.

Oben: Gelelektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (290 bp) aller Gruppen eines Tieres; DEX-Konzentration [µM] als Zahl unter den Banden. **NK:** Negativkontrolle, **+**: BNF Zusatz (10 µM). **Unten:** Quantifizierung der spezifischen mRNA ausgesuchter Gruppen mittels kompetitiver RT-PCR; Darstellung der Einzelwerte zweier Tiere. **Helle Säulen:** Gruppen ohne BNF, stattdessen DMSO 0,2%; **dunkle Säulen:** Gruppen mit BNF 10 µM.

5.3.2. DEX-Exposition in vitro nach vorangegangener BNF-Exposition

In dieser Versuchsserie wurden Leberschnitte unbehandelter Ratten zunächst für 24 Stunden mit BNF (10 μM) inkubiert und anschliessend für weitere 24 Stunden einer Inkubation mit DEX in verschiedenen Konzentrationen zur CYP3A1-Induktion zugeführt. Die Inkubationszeit betrug somit insgesamt 48 Stunden.

5.3.2.1. Nachweis des In-vitro-Effekts von BNF (EROD)

Die CYP1A-Induktion durch BNF in vitro spiegelte sich erneut durch die gesteigerte EROD wieder (s. obere horizontale Linie in Abb. 5.8. im Vergleich zur unteren Linie nach DMSO-Exposition). In der darauffolgenden 24-stündigen Inkubationszeit ohne Anwesenheit von BNF war der Induktionseffekt für CYP1A schon wieder abgeklungen (kein Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen ohne DEX). Ein langsames Abklingen der EROD-Aktivität liess sich verzeichnen, wenn der BNF-Exposition eine 24-stündige DEX-Exposition folgte. Durch die höheren DEX-Konzentrationen blieb der BNF-Effekt sogar vollständig erhalten. DEX allein führte dagegen, wie auch schon unter 5.3.1.1. beschrieben, nicht zu einer Steigerung der CYP1A-vermittelten EROD (s. Abb. 5.8. helle Säule mit DEX 1 μM).

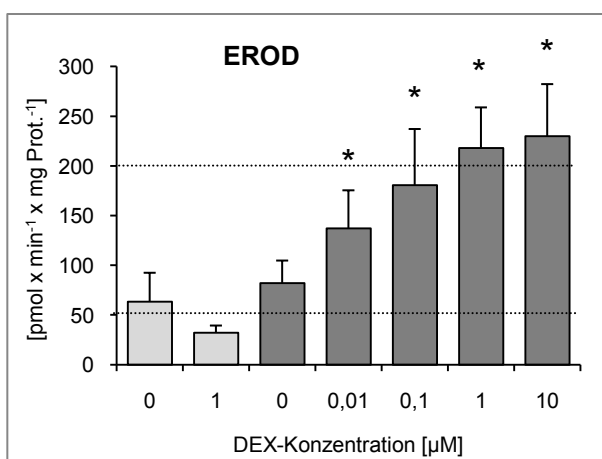


Abbildung 5.8.: CYP1A-abhängige EROD-Aktivität in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX (0,01-10 μM) im Anschluss an eine 24-stündige BNF-Exposition (10 μM , gelöst in DMSO). Gesamtinkubationszeit 48 Stunden.

Helle Säulen: Kontrollen ohne BNF-Exposition, stattdessen mit DMSO 0,2%; **dunkle Säulen:** Gruppen mit BNF-Exposition; **horizontale Linien:** mittlere Aktivität in Leberschnitten unmittelbar nach der 24-stündigen BNF- (obere

Linie) bzw. DMSO-Exposition (untere Linie); Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, $n = 5$; * = signifikanter Unterschied zur zugehörigen Gruppe ohne DEX und BNF (gepaarter t-Test, $p \leq 0,05$).

5.3.2.2. Die CYP3A1-Induktion *in vitro* durch DEX

5.3.2.2.1. CYP3A1-Aktivität (2 β - und 15 β -TH)

Beide TH-Reaktionen wurden durch DEX, wie schon in den bisher beschriebenen Versuchen, konzentrationsabhängig gesteigert (Abb. 5.9.). Eine vorangegangene Induktion von CYP1A durch BNF wirkte sich nicht negativ auf die DEX-bedingte Aktivitätssteigerung von CYP3A1 aus. Die mittleren Induktionsfaktoren (1 μ M DEX: fast 6 für beide Reaktionen; 10 μ M DEX: 9 bzw. 13) lagen in ähnlichen Bereichen wie bei gleichzeitiger Exposition beider Substanzen (s. Abschnitt 5.3.1.2.1.). In Bezug auf eine Inkubation mit DEX 1 μ M allein führt die Vorinkubation mit BNF sogar zu einer etwas besseren Induzierbarkeit der 2 β - und 15 β -TH (Induktionsfaktoren fast 6 gegenüber 2-3).

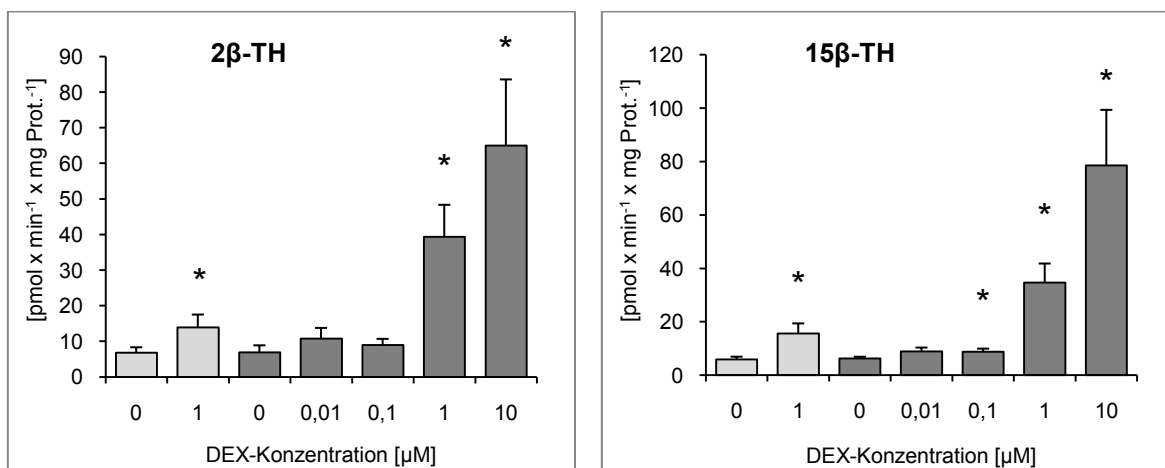


Abbildung 5.9.: CYP3A1-abhängige 2 β - (links) und 15 β -TH (rechts) in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX (0,01-10 μ M) im Anschluss an eine 24-stündige BNF-Exposition (10 μ M, gelöst in DMSO), Gesamtinkubationszeit 48 Stunden.

Helle Säulen: Gruppen ohne BNF-Exposition, stattdessen mit DMSO 0,2%; **dunkle Säulen:** Gruppen mit BNF-Exposition; Aktivitäten in Lebergewebe vor der Schnittpräparation $11 \pm 2,6$ (2 β -TH) und $13 \pm 1,7$ (15 β -TH) μ mol x min $^{-1}$ x mg Prot. $^{-1}$. Darstellung arithmetischer Mittelwerte mit Standardfehlern, n = 5; * = signifikanter Unterschied zur zugehörigen Kontrollgruppe ohne DEX (gepaarter t-Test, p \leq 0,05).

5.3.2.2.2. CYP3A1-mRNA-Expression

Das Resultat der Gelelektrophorese der CYP3A1-mRNA-Expression aller Proben einer Ratte ist in Teilabbildung 5.10. (oben) zu sehen. Erwartungsgemäss nahm die Bandenstärke mit zunehmender DEX-Konzentration zu. Die CYP3A1-mRNA-Konzentrationen ausgesuchter Gruppen zweier Tiere sind in Teilabbildung 5.10. (unten) dargestellt. Die Expression war konzentrationsabhängig durch DEX gesteigert worden. Dabei entsprach die Steigerung durch DEX nach BNF-Vorinkubation (18- bzw. 23-fach) derjenigen durch DEX allein (14- bzw. 20-fach). Die Induktion von CYP3A1 auf mRNA-Ebene durch DEX wurde demnach durch BNF auch nach sukzessiver Exposition nicht beeinflusst.

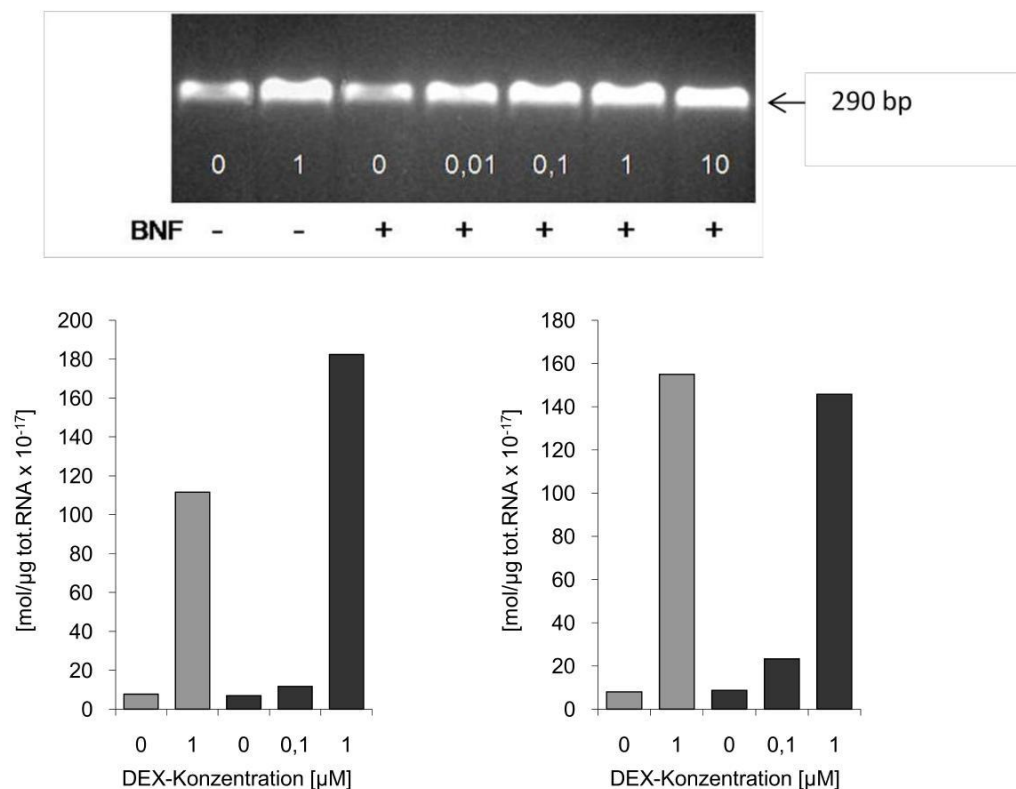


Abbildung 5.10.: CYP3A1-mRNA in Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit DEX (0,01-10 µM) im Anschluss an eine 24-stündige BNF-Exposition (10 µM, gelöst in DMSO). Gesamtinkubationszeit 48 Stunden.

Oben: Gelelektrophorese der spezifischen RT-PCR-Produkte (290 bp) aller Gruppen eines Tieres; DEX-Konzentration [µM] als Zahl unter den Banden. **SM:** Sizemarker; **+**: mit BNF vorinkubiert. **Unten:** Quantifizierung der spezifischen mRNA ausgesuchter Gruppen mittels kompetitiver RT-PCR; Darstellung der Einzelwerte zweier Tiere. **Helle Säulen:** Gruppen ohne BNF-Vorinkubation, stattdessen mit DMSO 0,2%; **dunkle Säulen:** Gruppen mit BNF-Vorinkubation.

6. Diskussion

Das In-vitro-Modell „Präzisionsleberschnitt“ hatte sich in den letzten Jahren für Untersuchungen zu CYP induzierenden Eigenschaften von Xenobiotika in zahlreichen Arbeiten bewährt. Die erhaltenen In-vitro-Ergebnisse korrelierten unter anderem auch gut mit Befunden aus In-vivo-Versuchen (Jessen et al. 2003, Martin et al. 2003, Martignoni et al. 2004, Cui et al. 2005, Persson et al. 2006, Glöckner et al. 2008).

Gegenstand dieser Arbeit war es, Auswirkungen einer CYP1A-Expression, erzeugt mit dem Modellinduktor BNF, auf die In-vitro-Induzierbarkeit von CYP3A durch den Modellinduktor DEX an Rattenleberschnitten zu untersuchen. Als Induktionsnachweis für CYP1A wurde an Leberschnittthomogenaten die EROD bestimmt. Die CYP3A1-Induktion wurde durch Aktivitätsmessung der 2 β - und 15 β -TH nachgewiesen, sowie die Gehaltsbestimmung spezifischer mRNA an ausgesuchten Tieren vorgenommen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte hauptsächlich geklärt werden, ob der Einsatz von Spenderlebergewebe mit vorbestehender oder gleichzeitiger CYP1A-Induktion CYP3A-induzierende Eigenschaften von zu testenden Substanzen im In-vitro-Modell „Präzisionsleberschnitt“ maskieren könnte. Untersuchungen mit dieser Kombinationsfolge von Induktoren lagen bisher noch nicht vor. Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit kann festgehalten werden, dass Spenderlebern mit vorbestehender oder zeitgleicher Exposition CYP1A-induzierender Verbindungen für In-vitro-Untersuchungen einer potentiellen CYP3A-Induktion uneingeschränkt verwendet werden können und der Nachweis auf Aktivitätsebene (2 β - und 15 β -TH) sowie auf mRNA-Ebene sicher erfolgen kann. Im Folgenden werden die einzelnen Befunde dieser Arbeit diskutiert.

6.1. Wirkung von DEX in vitro auf Leberschnitte unbehandelter Ratten

In einer Kontrollserie wurde zunächst der CYP3A-induzierende Effekt von DEX allein an Leberschnitten unbehandelter weiblicher Ratten betrachtet (Abschnitt 5.1.). Zum Einsatz kamen Lebern weiblicher Ratten, da sich Aktivitätssteigerungen der CYP3A-abhängigen 2 β - und 15 β -TH hier besser detektieren lassen als bei männlichen Tieren (Glöckner et al. 2003, 2008). Dies lässt sich unter anderem

durch eine postpubertäre, hormonbedingte niedrigere Basalaktivität (v.a. durch Repression von CYP3A2) und damit auch bessere In-vitro-Induzierbarkeit bei weiblichen Tieren erklären. Auf mRNA-Ebene konnte dagegen ein geschlechtsspezifischer Unterschied bei Induktionsversuchen bisher nicht gezeigt werden (Bjornsson et al. 2003, Glöckner et al. 2003). Diese genannten Beobachtungen in vitro waren vereinbar mit Befunden aus in vivo-Versuchen (Sonderfan et al. 1987). Dies spricht auch für die Eignung vom In-vitro-Modell Präzisionsleberschnitt zur Untersuchung von In-vivo-Verhältnissen.

Eine konzentrationsabhängige CYP3A1-Induktion durch DEX nach 24 Stunden Inkubation konnte erwartungsgemäß nachgewiesen werden (ab DEX 0,5 μM signifikant; s. Abb. 5.1.). Für die 2 β - und 15 β -TH fanden sich gesteigerte Aktivitäten im Mittel um das 17- bzw. 7-fache (1 μM DEX) und das 30- bzw. 24-fache (10 μM DEX) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Die etwas höheren Induktionsfaktoren bei der 2 β -TH, vor allem mit 1 μM DEX, könnten auf die sehr niedrigen Aktivitäten in den Kontrollschnitten zurückgeführt werden, welche nahe dem Leerwertbereich der Bestimmungsmethode lagen und als Bezugsgrösse dienten. In den späteren Versuchen (Kombinationsversuche mit BNF und DEX, s. Abschnitt 5.3.1.), in denen stets Gruppen ohne BNF-Exposition mitgeführt wurden, waren die Basalaktivitäten in den Kontrollgruppen ohne Induktorexposition geringfügig höher als in der Kontrollserie (Abschnitt 5.1.) bei etwa gleichen induzierten Aktivitäten mit 1 μM DEX, sodass die Induktionsfaktoren hier geringer ausfielen (3-4). Fasst man alle Versuche mit Leberschnitten unbehandelter Tiere hinsichtlich der Wirkung von DEX allein zusammen (n=16 aus den Abschnitten 5.1. und 5.3.1.), ergeben sich für DEX 1 μM mittlere Induktionsfaktoren von 8 (2 β -TH) und 6 (15 β -TH) nach 24-stündiger Inkubation. Diese Befunde, ebenso wie die gemessenen Absolutwerte der TH, zeigen eine gute Reproduktion von schon dargebotenen Ergebnissen der Jenaer Arbeitsgruppe (Glöckner et al. 2008, Reinhardt 2009). Andere Arbeitsgruppen untersuchten ebenfalls die CYP3A-Induktion in vitro. Allerdings können direkte Vergleiche mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen nur eingeschränkt erfolgen (Unterschiede in Inkubationsdauer, DEX-Konzentration, Modellreaktion, nur Relativangaben, anderes In-vitro-Modell). Martignoni et al. (2004) inkubierten Leberschnitte männlicher Ratten für 48 Stunden mit 100 μM DEX und erzielten eine knapp 4-fache Steigerung der 6 β -TH.

Lu und Li (2001) setzten DEX in verschiedenen Konzentrationen bis 100 μM in Hepatozytenkulturen von Ratten und Menschen ein und konnten in beiden Modellen ein eindeutig konzentrationsabhängiges Induktionsprofil nachweisen. Bei Ratten wurde mit 1 μM DEX eine ca. 3-fache und mit 10 μM eine ca. 6-fache Aktivitätssteigerung erreicht. Ein vergleichbares Profil erreichten sie auch an humanen Hepatozyten. Genauere Angaben sind aufgrund der gewählten Ergebnisdarstellung in der Literaturquelle nicht verfügbar. Meunier et al. (2000) konnten die konzentrationsabhängige CYP3A-Aktivitätssteigerungen durch DEX ebenfalls an humanen Hepatozyten nachweisen. Dabei wurde als Aktivitätsmaß die Nifedipin-Dehydrogenierung bestimmt. Mit DEX 1 μM wurde die Reaktion im Mittel um das 3-fache, mit DEX 100 μM um das 6-fache gesteigert. Neben der Induktion auf Enzymaktivitätsebene findet sich auch eine Arbeit, in der die CYP3A1-Erhöhung auf Proteinebene nachgewiesen wurde (Wauthier et al. 2004). Bei großer Varianz wurde mit Leberschnitten männlicher Ratten innerhalb von 24 Stunden ein mittlerer Induktionsfaktor von ca. 5 durch 10 μM DEX erreicht.

Zur Induktion auf mRNA-Ebenen liegen ebenfalls Literaturbefunde vor. Mit Leberschnitten männlicher Ratten fanden Cui et al. (2005) eine 30-50-fache Steigerung durch 3-30 μM DEX und Martignoni et al. (2004) eine 70-fache Steigerung mit 100 μM DEX. In den eigenen Untersuchungen ließ sich eine mittlere Expressionssteigerung um das 24-fache ($n=4$) bedingt durch DEX 1 μM gegenüber der Kontrollgruppe mit DMSO erkennen, wobei allerdings große Unterschiede zwischen den wenigen Stichproben bestanden. Dieses Ergebnis, das nicht aus der Kontrollserie (Abschnitt 5.1.), sondern aus den mitgeführten Kontrollgruppen der Kombinationsversuche (Abschnitt 5.3.) stammt, ist in der Größenordnung vergleichbar mit den genannten Literaturdaten und mit Befunden einer früheren Jenaer Arbeit (Glöckner et al. 2003). Zwar wurden damals überwiegend Leberschnitte männlicher Ratten verwendet, ein Geschlechtsunterschied bei der Induktion von CYP3A auf mRNA-Ebene besteht aber nicht (Bjornsson et al. 2003, Glöckner et al. 2003). Die ähnlichen Werte mit weiblichen Rattenlebern in dieser Arbeit mit den Resultaten von männlichen Rattenlebern von Glöckner et al. (2003) bestätigen dies. Unter Anwendung anderer In-vitro-Modelle, z.B. Hepatozytenkulturen von Ratten, berichteten verschiedene Arbeitsgruppen von einer 2-3-fachen (Surry et al. 1999) und 5-fachen Steigerung der CYP3A-mRNA mit 10 μM (t Hoen et al. 2000). Vergleiche von absoluten mRNA-

Konzentrationen sind nicht möglich, da in den zitierten Arbeiten keine Konzentrationsbestimmungen durchgeführt, sondern im Rahmen der meist angewandten Real-time-RT-PCR nur Induktionsfaktoren erfasst wurden. Der in dieser Arbeit erreichte Induktionsfaktor für CYP3A1-mRNA durch Inkubation mit DEX 1 μM liegt über den in der Literatur erwähnten Bereichen aus Versuchen mit Hepatozytenkulturen. Die Ursache könnte in der stabileren CYP-Expression in Präzisionsleberschnitten im Gegensatz zu Hepatozytenkulturen liegen, die einen deutlicheren Abfall der CYP-Expression während der In-vitro-Inkubation erleiden ('t Hoen et al. 2000). Auch die kürzere Inkubationszeit (24-48 Stunden versus max. 72 Stunden) wird hierbei begünstigend auf die allgemeine Synthesefunktion des Probengewebes gewirkt haben.

Insgesamt wurde durch die Kontrollversuche bestätigt, dass sich eine CYP3A1-Induktion in vitro mit Leberschnitten weiblicher Ratten sehr gut und reproduzierbar untersuchen lässt. Gewisse Schwankungen zwischen verschiedenen Studien sowohl auf Enzymaktivitäts- als auch auf mRNA-Ebene sind dabei nicht ungewöhnlich und könnten durch die komplexe Regulation dieses Systems bedingt sein (Gibson et al. 2002, Wortham et al. 2007, Braeuning 2009, Pan et al. 2009).

6.2. Einfluss von BNF in vivo auf die nachfolgende CYP3A-Induktion in vitro

Die sehr komplexen Induktionsmechanismen des CYP-Systems sind für einige CYP-Klassen weitgehend beschrieben, aber nicht vollständig aufgeklärt. Grundsätzlich gilt jedoch, dass die Signaltransduktionswege zur Expressionssteigerung der einzelnen Enzymfamilien nicht strikt voneinander zu trennen sind, sondern zahlreiche Interaktionen im Sinne des Cross Talk vorherrschen (Pelkonen et al. 2008). Diese könnten Untersuchungen zur Induktionseigenschaft von Substanzen beeinflussen und müssen daher Berücksichtigung bei der Anwendung von potentiell mit Induktorsubstanzen vorbelastetem Spendergewebe finden. Eine Vorbelastung mit CYP1A-induzierenden Substanzen ist nicht abwegig, da diese z.B. im Zigarettenrauch vorkommen. Ebenso ist der sehr oft verschriebene Wirkstoff Omeprazol ein bekannter Induktor dieser CYP-Familie (Lu und Li 2001). Um den Einfluss von Spendergewebe mit in vivo vorbestehender CYP1A-Expression auf eine DEX-vermittelte CYP3A1-Induktion in vitro untersuchen zu

können, wurden in einer Versuchsserie Leberschnitte BNF-vorbehandelter Tiere für die Inkubation mit DEX eingesetzt (Abschnitt 5.2.). Zunächst musste geklärt werden, ob eine ausreichende CYP1A-Induktion stattfand. Konstitutiv ist CYP1A1 kaum oder nur in geringer Menge in Rattenlebern und frisch präparierten Rattenleberschnitten exprimiert (Padgham und Paine 1993, Boess et al. 2003, Müller et al. 1998, Reinhardt 2009). In einem Versuch von Chaty et al. (2008), in dem Ratten Muscheln verspeisten, welche aufgrund eines Erdöltanker-Unglückes mit polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (AhR-Liganden) kontaminiert waren, konnte schon 12 Stunden nach deren Verzehr eine signifikant gesteigerte CYP1A-mRNA-Expression und EROD ex vivo nachgewiesen werden. Lange bekannt ist eine EROD-Induktion in vivo in Laborratten durch BNF, die 24 Stunden nach der Vorbehandlung messbar war (z.B. Guengerich et al. 1982). Auch im Jenaer Pharmakologischen Institut wurden solche Befunde mit männlichen Ratten erhoben (Mentzel und Patzer 1990). So war im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein BNF-Effekt in vivo 24 Stunden nach einmaliger oraler Verabreichung des Induktors zu erwarten und bestätigte sich auch anhand der EROD-Messungen ex vivo. In Lebergewebe unbehandelter Tiere war vor Schnittpräparation eine mittlere basale EROD-Aktivität von $218 \pm 27 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot}^{-1}$ (n=10) messbar, die mit Befunden vorausgegangener Untersuchungen mit männlichen oder weiblichen Ratten weitgehend übereinstimmte (Lupp et al. 2008, Reinhardt 2009). Dagegen konnte im Lebergewebe BNF-vorbehandelter Ratten vor Schnittpräparation eine in etwa 11-fach höhere CYP1A-Aktivität gemessen werden (Mittelwert $2425 \pm 251 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot}^{-1}$; n=6). Somit lag ein ausreichend in vivo stattgehabter BNF-Effekt als Ausgangslage für die nachfolgende CYP3A-Induktion vor.

Die Halbwertszeit für CYP1A1-mRNA wird in der Literatur mit 2,4 Stunden angegeben (Lekas et al. 2000, Gashaw 2003). Für die Enzymaktivität selbst divergieren die Angaben je nach Nachweismethode stark. Für die EROD konnte ein Abfall auf das Niveau der Basalaktivität nach 36 Stunden beobachtet werden (Chaty et al. 2008). Übereinstimmend hierzu klang in unseren Versuchen der Induktionseffekt schon innerhalb der folgenden 24 Stunden Inkubationszeit deutlich ab, erreichte jedoch noch nicht ganz das Ausgangsniveau unbehandelter Tiere. Dies traf auf sämtliche Inkubationsgruppen dieser Versuchsserie zu (s. Abb. 5.2., 5.5., 5.8.). So ist auch der Rückgang der Induktion nicht als mangelnde

Qualität der Schnitte zu werten, da neben der zu berücksichtigenden Halbwertszeit andere Funktionen wie TH und CYP3A1-mRNA-Synthese gut erhalten blieben. Als Nebenbefund zeigte sich, dass die in vivo induzierte EROD-Aktivität während der Inkubationszeit in Gegenwart von DEX langsamer abzuklingen schien. Die CYP1A-Aktivitätsabnahme war umso geringer, je höher die DEX-Konzentration im Inkubationsmedium war. In der Versuchsserie mit sukzessiver CYP1A- und CYP3A1-Induktion in vitro (Abschnitt 5.3.2.) konnte dies noch deutlicher beobachtet werden (s. Abb. 5.8.). Dabei ist eine CYP1A-Induktion durch DEX selbst eher unwahrscheinlich, da das Aktivitätsniveau zumeist abnahm und der vorangegangene BNF-Effekt kaum übertroffen wurde. Auch die mitgeführten DEX-Kontrollen der Kombinationsversuche zeigten keine Steigerung der EROD, sondern z.T. einen Verlust der Basalaktivität, der auch in der Lösungsmittelkontrolle bestimmt werden konnte. Übereinstimmend hierzu fanden sich in der Literatur Hinweise für eine CYP1A-Induktion durch DEX in vivo nur an Jungtieren, jedoch nicht in Lebern adulter Ratten (Götz und Longard 1991, Baldwin et al. 2006, Reinhardt 2009), was sich auf mRNA-Ebene bestätigen ließ (Meredith et al. 2003, Martignoni et al. 2004). Dieser Effekt könnte auf posttranskriptioneller Stabilisation von CYP1A-mRNA oder Proteinmodulation durch DEX und damit reduzierter Degradation basieren oder einer verminderten Entdifferenzierung entsprechen. DEX wird eine stabilisierende Wirkung auf differenzierte Funktionen zugesprochen (Laishes and Williams 1976, Waxman et al. 1990, Silva et al. 1998), wogegen ein CYP1A1-Anstieg als Zeichen einer Entdifferenzierung angesehen wird (Padgham and Paine 1993, Boess et al. 2003).

Betrachtet man nun die CYP3A1-Induktion, so konnte DEX dies eindeutig bewirken (s. Abb. 5.3. und 5.4.). Die Konzentrationsabhängigkeit war wieder gegeben und führte zu dem gleichen Induktionsprofil wie in der Kontrollserie zu beobachten war. Die Induktion der CYP3A-abhängigen TH blieb sicher nachweisbar, obwohl die Aktivitäten beider TH-Reaktionen nach Induktion mit DEX dabei unterhalb derjenigen von Leberschnitten unbehandelter Ratten lagen (Absolutwerte und Induktionsfaktoren). So scheint BNF die CYP3A-Aktivität zu senken, wenngleich hier nicht in signifikantem Maß. Dies ist auch in der Literatur beschrieben: Shiverick (1981) löste an Ratten mit BNF in vivo eine Verminderung basaler CYP3A-abhängiger Aktivitäten aus, was auf den selektiven Verlust dieser CYP-Form zurückgeführt wurde. Shaban et al. (2005) beschrieben eine CYP3A-

Downregulation auf allen Ebenen an Ratten nach Behandlung mit dem AhR-Liganden Sudan III. Möglicherweise ist dies durch eine Downregulation von Expressionsfaktoren für CYP3A aufgrund von aktiviertem AhR bedingt (Shaban et al. 2004). Auf mRNA-Ebene waren an BNF-vorbehandeltem Gewebe höhere Steigerungsfaktoren als auf Enzymaktivitätsebene zu notieren, die, wie auch die absoluten mRNA-Konzentrationen, denen von Leberschnitten unbehandelter Tiere entsprachen. Damit scheint die in der Literatur beschriebene Downregulation des CYP3A-Systems durch AhR-Liganden nur kurzzeitig zu bestehen, da sie an den eigenen Stichproben inkubierter Leberschnitte nicht mehr sichtbar war. Ein möglicher posttranskriptioneller Mechanismus würde im Widerspruch zu den Befunden von Shaban et al. (2005) stehen. Induktionsversuche mit gleicher Abfolge an Induktoren finden sich nicht in der Literatur, sodass Vergleiche mit Ergebnissen anderer Arbeiten nicht möglich sind.

Als wesentliches Ergebnis lässt sich zusammenfassen, dass eine CYP1A-Induktion in vivo keinen wesentlichen Einfluss auf eine nachfolgende CYP3A1-Induktion in vitro ausübt die sowohl auf Enzymaktivitäts- als auch auf mRNA-Expressionsebene sicher erkennbar bleibt. Die beobachtete Verminderung der TH stellte kein Hindernis für die In-vitro-Induzierbarkeit dar.

6.3. Einfluss von BNF in vitro auf die gleichzeitige und nachfolgende CYP3A1-Induktion in vitro

Bisher konnte gezeigt werden, dass BNF nach In-vivo-Verabreichung keinen relevanten Einfluss auf eine CYP3A1-Induktion in vitro ausübt. Dass BNF auch in vitro die CYP3A1-Induktion nicht relevant zu beeinflussen vermag, wird im Folgenden diskutiert.

6.3.1. Einfluss von BNF in vitro auf die gleichzeitige CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX

Zunächst wurde der BNF-Effekt in vitro auf die CYP1A1-Aktivität als signifikante Steigerung der EROD dokumentiert, was früheren Erfahrungen entsprach (Müller et al. 1996, Glöckner et al. 2008, Reinhardt 2009). Die Inkubation von unbehandelten Leberschnitten mit BNF und DEX gleichzeitig führte zu einer Steigerung des BNF-Effektes im Vergleich zu einer Inkubation mit BNF allein. Dieser

begünstigende Einfluss von DEX auf die CYP1A-Induktion durch BNF bei gleichzeitiger Exposition, der im Rahmen dieser Arbeit einen Nebebefund darstellt, ist bekannt und wurde schon für Leberschnitte beschrieben (Müller et al. 1996, Reinhardt 2009). Der Gehalt an CYP1A1 war dabei durch DEX selbst nicht beeinflusst worden, wie anhand von Enzymprotein-Bestimmungen in entsprechenden Kontrollen ausgeschlossen werden konnte (Müller et al. 1996). Unterstützt wird dies durch Martignoni et al. (2004), die ebenfalls an Rattenleberschnitten Induktionsversuche mit DEX durchführten und auf mRNA-Ebene keine CYP1A1-induzierenden Eigenschaften für DEX allein erkennen konnten. Die möglicherweise sehr komplexen Mechanismen, die anhand von Untersuchungen mit ganz anderen, zellbasierten In-vitro-Systemen als Ursache solcher Interaktionen angesehen werden (Dvorak et al. 2008, Sonneveld et al. 2007), waren nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Bei den Befunden mit Zellkulturen handelte es sich nicht um eine Interaktion nur in eine Richtung. Dvorak et al. (2008) beschrieben eine wechselseitige Beeinflussung der zellulären Signaltransduktoren bei der Induktion verschiedener CYP-Klassen, die sich u.a. in einer Abschwächung der DEX-Wirkung auf den Glucocorticoid-Rezeptor bei Einwirkung eines AhR-Liganden zeigte. Shaban et al. (2004) stellten fest, dass der AhR-Ligand Sudan III eine Repression von RXR verursachte; dieser Faktor spielt auch bei der CYP3A1-Induktion eine Rolle. In den Versuchsergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach kombinierter In-vitro-Inkubation mit beiden Induktoren aber kein signifikanter Unterschied in der CYP3A1-Induktion, dem eigentlichen Untersuchungsgegenstand, im Vergleich zu einer Inkubation mit DEX allein. Ein Unterschied war weder auf Enzymaktivitäts- noch auf mRNA-Ebene zu dokumentieren (s. Abb. 5.6. und 5.7.). Im Einklang hierzu stehen auch Ergebnisse von Reinhardt (2009), welche neben ihrem Hauptziel, der Untersuchung der CYP1A1-Induktion, eine ungestörte CYP3A1-Induktion durch DEX in Gegenwart von BNF nachgewiesen hatte. Dabei wurden ähnliche Umsatzraten wie in dieser Arbeit unter vergleichbaren Inkubationsbedingungen erreicht. Die Erkenntnisse aus den genannten Versuchen mit Leberschnitten stehen den zitierten Ergebnissen von Dvorak et al. (2008) und Shaban et al. (2004) aus Hepatozyten gegenüber. Die Unterschiede könnten am ehesten auf veränderten mRNA- und Enzymexpressionsmustern ('t Hoen et al.

2000, Boess et al. 2003), schnellerer Entdifferenzierung im Vergleich zu Leberschnitten sowie auf ungleichen Inkubationsbedingungen beruhen.

Obwohl in vivo eine gewisse Depression von CYP3A durch BNF erzeugt worden war, wenngleich ohne nennenswerten Einfluss auf die CYP3A1-Induzierbarkeit (s. Abschnitt 6.2.), hatte BNF in vitro keine solchen Auswirkungen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass während der 24-stündigen Expositionszeit parallel Veränderungen in den Schnitten stattfanden, die durch mehr oder weniger starke hypoxische Zustände im Inneren der Schnitte verursacht wurden. Dazu gibt es elektronenmikroskopische Befunde von Neupert et al. (2003). Eine solche Hypoxie könnte möglicherweise schon selbst zu einer gewissen AhR-Aktivierung auch in Schnitten ohne BNF-Exposition geführt haben, da dieses System bei der Anpassung an Hypoxie eine Rolle spielt (Ma 2001). Die basale CYP3A-abhängige Biotransformation war (dadurch?) ohnehin schon sehr niedrig, so dass eine weitere Verminderung durch BNF nicht abgrenzbar gewesen sein mag. Zur Erhärtung dieser Vermutung wurden allerdings keine weiteren Untersuchungen, die den Rahmen der Arbeit gesprengt hätten, durchgeführt.

Als wesentliches Ergebnis dieser Versuchsserie kann festgehalten werden, dass die gleichzeitige In-vitro-Induktion von CYP3A1 durch dessen Modellinduktor DEX und CYP1A durch den Modellinduktor BNF an Pärzisionsleberschnitten von Ratten sehr gut möglich ist. Dabei kommt es in vitro offenbar nicht zu auffallenden signifikanten Interaktionen, die eine CYP3A1-Induktion irrtümlicher Weise maskieren könnten. Die CYP3A1-induzierende Eigenschaft des Modellinduktors DEX bleibt auf Enzymaktivitäts- und Genexpressionsebene sicher erkennbar, auch wenn zeitgleich eine CYP1A-Induktion stattfindet.

6.3.2. Einfluss von BNF in vitro auf die nachfolgende CYP3A-Induktion in vitro durch DEX

Die Untersuchung des Einflusses von BNF in vivo auf die nachfolgende CYP3A1-Induktion in vitro durch DEX erforderte eine Vorbehandlung der Versuchstiere in vivo (Abschnitt 6.2.). Aus ethischen Gründen gilt bei notwendigen Tierversuchen der Grundsatz wenn möglich jegliche Eingriffe und Behandlungen, welche Stress, Schmerz, Leid oder Schäden am Tier verursachen könnten zu vermeiden. Insofern stellte sich auch die Frage, ob In-vivo-Vorbehandlungen durch BNF für

nachfolgende In-vitro-Induktionsversuche mit DEX nicht gänzlich durch sukzessive In-vitro-Induktionen ersetzt werden könnten. So wäre es möglich, Behandlungen der Versuchstiere in vivo zu vermeiden. Mehrere Arbeiten konnten vergleichbare Verhältnisse zwischen Induktionen in vivo und in vitro nachweisen (Jessen et al. 2003, Martignoni et al. 2004). Nach sukzessiver In-vitro-Exposition beider Induktoren sollte es demnach zu vergleichbaren Ergebnissen wie nach In-vivo-Vorbehandlung kommen. Allerdings betrug die Gesamtinkubationszeit der Leberschnitte 48 Stunden, also doppelt so lang wie in der Versuchsanordnung nach In-vivo-Vorbehandlung des Spendergewebes. Zeitabhängige Veränderungen sind im Modell „Präzisionsleberschnitt“ beschrieben. Obwohl Stoffwechselprozesse nach 48 Stunden unter Zugabe eines Induktors noch stabil sein sollen (Gebhardt et al. 2003), können zunehmend nekrotische Prozesse vor allem in Innenschichten fern von Gefäßstrukturen der Schnitte beobachtet werden (Lupp et al. 2001, Neupert et al. 2003), welche sich auf die Biotransformationsraten auswirken können. Wie bereits in Abschnitt 6.2. erwähnt, war der erreichte Induktionseffekt von BNF in vivo in den Präzisionsschnitten von BNF-vorbehandelten Rattenlebern nach 24 Stunden Inkubation in vitro weitgehend abgeklungen (s. Abb. 5.2.). Die 24-stündige Vorinkubation mit BNF verursachte eine signifikante Aktivitätssteigerung der EROD im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 5.8., horizontale Linien). Die Biotransformation war mit einem Induktionsfaktor um 4 zwar geringer gesteigert als nach Induktion in vivo (Faktor 11 gegenüber Lebergewebe unbehandelter Tiere), war aber dennoch deutlich. Unter vergleichbaren Bedingungen wurden in Leberschnitten unbehandelter weiblicher oder männlicher Ratten mit 5 oder 10 μM BNF Induktionsfaktoren von 7-10 erreicht (Lupp et al. 2008, Reinhardt 2009). Der etwas niedrigere Faktor von 4 in den eigenen Versuchen sollte daher nicht überbewertet werden, zumal die Basalaktivität bei dieser Serie mit $72 \pm 18 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$ relativ hoch war (sonst durchschnittlich meist ca. $50 \text{ pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg Prot.}^{-1}$). Die BNF-Wirkung war nach weiteren 24 Stunden Inkubation ohne Induktorsubstanz fast gänzlich abgeklungen, wie auch im Versuch an Präzisionsleberschnitten von in vivo vorbehandelten Tieren beobachtet werden konnte (s. Abschnitte 5.2.1., 6.2.). In Leberschnitten mit DEX-Exposition waren die EROD-Aktivitäten dagegen langsamer abnehmend oder gar aufrecht erhalten. Die Eigenschaft von DEX, den Induktionseffekt von BNF länger aufrecht zu erhalten, wurde als Nebenfund bereits in Abschnitt 6.2.

diskutiert. Soweit zeigte sich *in vitro* die BNF-Wirkung betreffend insgesamt ein vergleichbares Ergebnis wie nach Vorbehandlung *in vivo*. In den Kontrollgruppen ohne BNF lag nach 48 Stunden Inkubation die Basalaktivität für die EROD im Bereich unbehandelter Lebergewebe und sprach gegen eine Entdifferenzierung der Hepatozyten während der Inkubationszeit (Boess et al. 2003).

Die unmittelbar auf die CYP1A-Induktion darauffolgende CYP3A1-Induktion durch DEX in der 24.-48. Stunde der Inkubation führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie in den anderen Versuchsserien. Die Biotransformationsraten waren für beide TH mit 1 μ M DEX allein dagegen etwas schwächer induziert worden als in den Kombinationsgruppen nach BNF (s. Abb. 5.9.). Auf mRNA-Ebene waren keine Unterschiede in den Absolutwerten sowie Induktionsfaktoren zwischen Gruppen mit und ohne BNF-Vorinkubation zu erkennen, so dass posttranskriptionelle Ursachen vermutet werden müssen. Da DEX erst nach 24 Stunden Inkubation zugesetzt wurde, ist nicht mehr von einer DEX-bedingten Verlangsamung der Entdifferenzierung auszugehen. Die niedrigen TH-Aktivitäten trotz Induktor (DEX) mögen als Ausdruck von Funktionsverlusten *in vitro* angesehen werden. Warum diese allerdings durch eine vorangegangene BNF-Exposition gemildert werden, ist nicht zu erklären, entsprechende Literaturbefunde liegen nicht vor. Dieser Einfluss *in vitro* weicht etwas von den Befunden nach BNF *in vivo* ab, da, anders als sukzessiv *in vitro*, in BNF-vorbehandeltem Gewebe keine bessere CYP3A1-Induktion gesehen wurde. Auch hier muss wieder spekuliert werden, dass *in vitro* möglicherweise Überschneidungen zwischen mehreren Prozessen stattfinden, die den Einfluss verschiedener Induktoren unübersichtlich erscheinen lassen. Übereinstimmend ist dennoch, dass bei beiden Vorgehensweisen, BNF zuvor *in vivo* oder *in vitro*, eine CYP3A1-Induktion *in vitro* sichtbar blieb.

Insgesamt waren die Ergebnisse beider Versuchsanordnungen, einer Vorbehandlung *in vivo* oder einer Vorinkubation *in vitro* mit BNF und der nachfolgenden CYP3A1-Induktion *in vitro* mit DEX, ähnlich. Es konnte, wie in allen anderen Versuchsserien dieser Arbeit, der CYP3A1-induzierende Effekt von DEX auf Enzymaktivitäts- und mRNA-Ebene klar nachgewiesen werden, ohne dabei von einer CYP1A-Induktion wesentlich beeinflusst zu werden. In der sukzessiven Induktionsfolge war nach *In-vitro*-Inkubation mit BNF der DEX-Effekt auf Biotransformationsebene (TH) sogar deutlicher als ohne BNF-Vorinkubation.

Somit könnten In-vivo-Vorbehandlungen mit BNF durch eine In-vitro-Inkubation ersetzt werden, ohne dass Induktionsseigenschaften für CYP3A maskiert werden.

7. Schlussfolgerungen

Aus den vorliegenden Untersuchungen können folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die CYP3A-Induktion ist sowohl auf Aktivitäts- als auch auf mRNA-Ebene nicht nur in Leberschnitten unbehandelter Ratten, sondern auch nach CYP1A-Induktion in vivo möglich. Spendergewebe mit bestehendem unterschiedlichen CYP1A-Expressionsstatus können somit für In-vitro-Untersuchungen von Substanzen eingesetzt werden, ohne CYP3A-induzierende Eigenschaften der zu untersuchenden Verbindung zu maskieren.
2. Durch gleichzeitige In-vitro-Einwirkung von CYP3A- und CYP1A-Induktoren wird die CYP3A-Induktion nicht beeinflusst. Bei Untersuchungen von Substanzen mit unbekannten Induktionseigenschaften kann dadurch eine CYP3A-Induktion auch dann nachgewiesen werden, wenn gleichzeitig CYP1A-induzierende Eigenschaften vorliegen.
3. Auch die sukzessive In-vitro-Einwirkung von CYP1A- und CYP3A-Induktoren behindert nicht den Nachweis der CYP3A-Induktion, sondern verbessert eher die TH-Induzierbarkeit. Allfällige Vorbehandlungen von Versuchstieren zur In-vivo-Induktion können damit zumindest orientierend durch In-vitro-Induktion von Leberschnitten ersetzt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, auch Human-gewebe einzusetzen, bei dem sich eine In-vivo-Vorbehandlung verbietet.

Insgesamt wirkt sich der CYP1A-Expressionszustand der Spenderleber nicht einschränkend auf den Nachweis einer potentiellen CYP3A-Induktion in vitro aus. Das In-vitro-Modell „Präzisionsleberschnitt“ ist für Untersuchungen zur CYP-Induktion sehr gut geeignet.

8. Literaturverzeichnis

- Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke. 2005. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Neunte Auflage. München: Elsevier GmbH
- Axelrod J. 1960. Biochemical factors in the activation and inactivation of drugs. Naunyn Schmiedeberg's Arch Exp Pathol Pharmacol, 238:24-35.
- Baldwin SJ, Bramhall JL, Ashby CA, Yue L, Murdock PR, Hood SR, Ayrton AD, and Clarke SE. 2006. Cytochrome P450 Gene Induction In Rats Ex Vivo Assessed By Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Taqman). Drug Metab Dispos, 34:1063-1069.
- Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King PS, Miwa G, Ni L, Kumar G, Mcleod J, Obach RS, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, and Wrighton S. 2003. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug Interaction studies: a pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. Drug Metab Dispos, 31:815-832.
- Blumberg B., Evans R.M. 1998. Orphan nuclear receptors - new ligands and new possibilities. Genes Dev, 12:3149-3155.
- Boess F, Kamber M, Romer S, Gasser R, Müller D, Albertini S, Suter L. 2003. Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. Toxicol Sci, 73:368-402.
- Bogaards JJP, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, and Walther B. 2000. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. Xenobiotica, 30:1131-1152.
- Borozaan I, Chen L, Sun J, Tannis LL, Guindi M, Rotstein OD, Heathcote J, Edwards AM, Grant D, McGilvray ID. 2006. Gene Expression Profiling of Acute Liver Stress During Living Donor Liver Transplantation. American Journal of Transplantation, 6:806-824.

- Braeuning A. 2009. Regulation of Cytochrome P450 Expression by Ras- and beta-Catenin-Dependent Signaling. *Curr Drug Metab*, 10(2):138-158.
- Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25:169-193.
- Chaty S, Rodius F, Lanhers MC, Burnel D, Vasseur P. 2008. Induction of CYP1A1 in rat liver after ingestion of mussels contaminated by Erika fuel oils. *Arch Toxicol*, 82:75-80.
- Connolly MA, Clausen PA, and Lazar JG. 2003. RNA purification. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS, Hrsg. *PCR primer: a laboratory manual*. Zweite Auflage. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Press, 117.
- Cooper DY, Levin SS, Narasimhulu S, Rosenthal O, and Estabrook RW. 1965. Photochemical Action Spectrum of the Terminal Oxidase of Mixed Function Oxidase System. *Science*, 147:400-402.
- Cui X, Thomas A, Han Y, Palamanda J, Montgomery D, White RE, Morrison RA and Cheng KC. 2005. Quantitative PCR assay for cytochromes P450 2B and 3A induction in rat precision-cut liver slices: Correlation study with induction in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 25:234-243.
- Dvorak Z, Vrzal R, Pavek P, Ulrichova J. 2008. An Evidence for Regulatory Cross-Talk between Aryl Hydrocarbon Receptor and Glucocorticoid Receptor in HepG2 Cells. *Physiol Res*, 57:427-435.
- Edwards MJ, Keller BJ, Kauffmann FC, Thurmann RG. 1993. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 119:275-279.
- Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR, and Lake BG. 2003. Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metabolism and Disposition*, 31:282-288.
- Ekins S. 1996. Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev*, 28:591-623.

- Estler CJ, Hrsg. 2000. Pharmakologie und Toxikologie: Lehrbuch für Studierende der Medizin, Pharmazie und Naturwissenschaften. 5 Auflage. Stuttgart; New York: Schattauer.
- Fisher R, Putnam CW, Koep LJ, Sipes IG, Gandolfi AJ, Brendel K. 1991. Cryopreservation of pig and human liver slices. *Cryobiology*, 28:131-142.
- Fisher RL, Hasal SJ, Sanuik JT, Gandolfi AJ and Brendel K. 1995. Determination of optimal incubation media and suitable slice diameters in precision-cut liver slices: Optimization of tissue slice culture, part 2. *Toxicol Methods*, 5:115-130.
- Fisher RL, Gandolfi AJ, Brendel K. 2001. Human liver quality is a dominant factor in the outcome of in vitro studies. *Cell Biology and Toxicology*, 17:179-189.
- Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD. 1998. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . *Nature*, 395:612-615.
- Gandolfi JA, Jayanthika W, and Brendel K. Use of Precision-Cut Liver Slices as an In Vitro Tool for Evaluating Liver Function. 1996. *Toxicologic Pathology*, 24:58-61.
- Garfinkel D. 1958. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*, 77:493-509.
- Gashaw I. 2003. Veränderungen in der Genexpression fremdstoffmetabolisierender Enzyme und Bedeutung genetischer Polymorphismen unter besonderer Berücksichtigung von HIV-Virustatika. [Dissertation]. Berlin: Humboldt Universität.
- Gause WC, Adamovics J. 1995. Use of PCR to quantitate relative differences in gene expression. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS, Hrsg. PCR primer: a laboratory manual. Erste Auflage. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gebhardt R, Hengstler JG, Müller D, Glöckner R, Buenning P, Laube B, Schmelzer E, Ullrich M, Utesch D, Hewitt N, Ringel M, Reder-Hilz B, Bader

- A, Langsch A, Koose T, Burger HJ, Maas J, and Oesch F. 2003. New Hepatocyte In Vitro Systems for Drug Metabolism: Metabolic Capacity and Recommendations for Application in Basic Research and Drug Development, Standard Operation Procedures. *Drug Metabolism Reviews*, 35:145-213.
- Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Fabre JM, Sa-Cunha A, Poellinger L, Maurel P, Daujat-Chavanieu M. 2006. Role of CYP3A4 in the regulation of the aryl hydrocarbon receptor by omeprazole sulphide. *Cellular Signalling*, 18:740-750.
- Gibson GG, Plant NJ, Swales KE, Ayrton A and El-Sankary W. 2002. Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica*, 32:165-206.
- Gillette JR. 1963. Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanism. *Fortschritte der Arzneimittelforschung*. Basel; Stuttgart: Birkhäuser-Verlag.
- Glöckner R, Steinmetzer P, Drobner C and Müller D. 1999. Use of Fresh and Cryopreserved Human Liver Slices in Toxicology with Special Reference to In Vitro Induction of Cytochrome P450. *Toxicology in Vitro*, 13:531-535.
- Glöckner R, Sünkel E, Steinmetzer P and Müller D. 2001. Influence of different CYP1A1-mRNA expression states after induction in vivo on subsequent inducibility in vitro in rat liver slices. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 363 S:R164.
- Glöckner R, Steinmetzer P, Lupp A, Danz M and Müller D. 2002. In vitro induction of cytochrome P450 2B1- and 3A1-mRNA and enzyme immunostaining in cryopreserved precision-cut rat liver slices. *Toxicology*, 176:187-193.
- Glöckner R, Wagener J, Lieder A and Müller D. 2003. In vitro induction of cytochrome P4503A1-mRNA and testosterone hydroxylation in precision-cut liver slices from male and female rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54:411-415.

- Glöckner R, Reinhardt M and Müller D. 2005. Is in-vitro induction of CYP1A in rat liver slices by beta-naphthoflavone (BNF) influenced by CYP3A inducing dexamethasone (DEX)? Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, 371 S1:R94.
- Glöckner R, Lieder A and Lupp A. 2008. Determination of CYP activity in precision-cut liver slices: whether to use intact slices or slice homogenate. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 392:1167-1172.
- Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J and Yager JD. 1995. Cytochrome P-450 1A1/1A2 induction, albumin secretion, and histological changes in cultured rat liver slices. In Vitro Toxicol, 8:357-367.
- Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J, and Yager JD. 1997. Cytochrome P450 isoenzyme activities in cultured rat and mouse liver slices. Xenobiotica, 27(4):341-355.
- Goodwin B, Redinbo MR, Kliever SA. 2002. Regulation of CYP3A Gene transcription by the Pregnane X Receptor. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 42:1-23.
- Götz B und Longard C. 1991. Die Wirkung von Dexamethason, Prednisolon und Pregnenolon- α -Carbonitril auf die postnatale Entwicklung der Cytochrom-P-450-abhängigen Biotransformation. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS. 1982. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes p-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or beta-naphthoflavone. Biochemistry, 21(23):6019-30.
- Guengerich FP. 1999. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 39:1-17.
- Guillouzo A. 1998. Liver cell models in in vitro toxicology. Environ Health Perspect, 106(2):511-532.
- Gunderson MP, Kohno S, Blumberg B, Iguchi T, Guillet Jr LJ. 2006. Up-regulation of the alligator CYP3A77 gene by toxaphene and dexamethasone

and its short term effect on plasma testosterone concentrations. *Aquatic Toxicology*, 78:272-283.

Handschin C, Podvynec M, Meyer U. 2003. In silico Approaches, and In Vitro and In Vivo Experiments to Predict Induction of Drug Metabolism. *Drug News Perspect* 16(7):423.

Isin E, Guengerich FP. 2008. Substrate binding to cytochromes P450. *Anal Bioanal Chem*, 392:1019–1030.

Jessen BA, Mullins JS, de Peyster A, Stevens JG. 2003. Assessment of Hepatocytes and Liver Slices as in Vitro Test Systems to Predict in Vivo Gene Expression. *Toxicological Sciences*, 75:208–222.

Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NCO, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA, Moore JT. 2000. The Pregnane X Receptor: A Promiscuous Xenobiotic Receptor That Has Diverged during Evolution. *Mol Endo*, 14(1):27-39.

Kamataki T, Maeda K, Shimada M, Kitani K, Nagai T, and Kato R. 1985. Age-Related Alteration in the Activities of Drug-Metabolizing Enzymes and Contents of Sex-Specific Forms of Cytochrome P-450 in Liver Microsomes from Male and Female Rats¹. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233: 222-228.

Khan AA, Chow EC, van Loenen-Weemaes AM, Porte RJ, Pang KS, Groothuis GM. 2009. Comparison of effects of VDR versus PXR, FXR and GR ligands on the regulation of CYP3A isozymes in rat and human intestine and liver. *Eur J Pharm Sci*, 37(2):115-25.

Klingenberg M. 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 75:376-386.

Klinger W und Müller D. 1974. The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods. *Z Versuchstierkd*, 16:149-153.

Klinger W. 1982. Biotransformation of drugs and other xenobiotics during postnatal development. *Pharmacol Ther*, 16:377-429.

- Krumdieck CL, Dos Santos JE, Ho KJ. 1980. A New Instrument for the Rapid Preparation of Tissue Slices. *Analytical Biochemistry*, 104:118-123.
- Laishes BA, Williams GM. 1976. Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. II. Dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morphology. *In Vitro*, 12(12):821-32.
- Lake BG, Charzat C, Tredger JM, Renwick AB, Beamad JA, and Price RJ. 1996. Induction of cytochrome P450 isoenzymes in cultured precision-cut rat and human liver slices. *Xenobiotica*, 26:297-306.
- Lake BG, Ball SE, Renwick AB, Tredger JM, Kao J, Beamad JA, and Price RJ. 1997. Induction of CYP3A isoforms in cultured precisioncut human liver slices. *Xenobitica*, 27:1165-1173.
- Lekas P, Tin KL, Lee C, Prokipcak RD. 2000. The human cytochrome P450 1A1 mRNA is rapidly degraded in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys*, 384:311-318.
- Lerch C. 2008. Einfluss veränderter CYP2B1-Aktivität und -mRNA-Expression nach Induktion in vivo auf die nachfolgende Induzierbarkeit in vitro an Rattenleberschnitten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Lerche-Langrand C, Toutain HJ. 2000. Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology*, 153:221-253.
- Li AP, Kaminski DL, Rasmussen A. 1995. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology*, 104:1–8.
- Lieder A. 2007. Veränderung der CYP3A1-Expression und -Aktivität an Rattenleberschnitten nach Induktion in vivo und in vitro [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Lu C and Li AP. 2001. Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague–Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chemico-Biological Interactions*, 134:271–281.
- Lupp A, Danz M, Müller D. 2001. Morphology and cytochrome P450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. *Toxicology*, 161:53-66.

- Lupp A, Glöckner R, Etzrodt J, Müller D. 2008. Precision-cut liver slices from rats of different ages: basal cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and inducibility. *Anal Bioanal Chem*, 392:1173-1184.
- Ma Q. 2001. Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr Drug Metab*, 2(2):149-64.
- Martignoni M, de Kanter R, Grossi P, Mahnke A, Saturno G and Monshouwer M. 2004. An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem-Biol Interact*, 151:1-11.
- Martin H, Sarsat JP, de Waziers I, Housset C, Balladur P, Beaune P, Albaladejo V and Lerche-Langrand C. 2003. Induction of Cytochrome P450 2B6 and 3A4 Expression by Phenobarbital and Cyclophosphamide in Cultured Human Liver Slices. *Pharmaceutical Research*, 20(4):557-568.
- Maurel P. 1996. The CYP3A family. In: Ioannides C, Hrsg. *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. Boca Raton: CRC Press, 241-270.
- Mentzel T, Patzer L. 1990. Der Einfluss von Prostaglandin F 2 α auf die Induktion des hepatischen Cytochrom-P450-Systems durch Phenobarbital und Betanaphthoflavin: Abhängigkeit der O-Dealkylaseaktivität vom Lebensalter (PEROD), der Induktordosis (EROD) und von dem Modulator Prostaglandin F 2 α [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Meredith C, Scott MP, Renwick AB, Price RG, Lake BG. 2003. Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica*, 33(5):511–527.
- Meunier V, Bourrie M, Julian B, Marti E, Guillou F, Berger Y and Fabre G. 2000. Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow-up. *Xenobiotica*, 30(6):589-607.
- Michalets EL. 1998. Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy*, 18:84-112.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 51:263-273.
- Müller D. 1990. Influence of xenobiotics on drug metabolism and its sensitive detection. Exp Pathol, 39:187-194.
- Müller D, Glöckner R, Rost M. 1996. Monooxygenation, cytochrome P4501A1 and P4501A1-mRNA in rat liver slices exposed to beta-naphthoflavone and dexamethasone in vitro. Exp Toxic Pathol, 48:433-438.
- Müller D, Glöckner R, Rost M and Steinmetzer P. 1998. Monooxygenation, cytochrome P450-mRNA expression and other functions in precision-cut rat liver slices. Exp Toxicol Pathol, 50:507-513.
- Nastevska C, Gerber E, Horbach M, Röhrdanz E, Kahl R. 1999. Impairment of TNF- α expression and secretion in primary rat liver cell cultures by acetaminophen treatment. Toxicology, 133:85-92.
- Nebert DW, Nelson DR, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR. 1989. The P450 superfamily: updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci. DNA, 8(1):1-13.
- Neupert D, Glöckner R, Neupert G, Müller D. 2003. Ultrastructural changes in hepatocytes of precision-cut rat liver slices after incubation for 24 and 48 hours. Exp Toxicol Pathol, 54(5-6):481-8.
- Olinga P, Meijer DKF, Slooff MJH and Groothuis GMM. 1997. Liver Slices In vitro Pharmacotoxicology with Special Reference to the Use of Human Liver Tissue. Toxicology in Vitro, 12:77-100.
- Omura T and Sato R. 1962. A new cytochrome in liver microsomes. J Biol Chem, 237:1375-1376.
- Padgham CRW and Paine AJ. 1993. Altered expression of cytochrome-P-450 messenger RNAs, and potentially of other transcripts encoding key hepatic

- functions, are triggered during the isolation of rat hepatocytes. *Biochem J*, 289:621-624.
- Pan YZ, Gao WQ, Yu AM. 2009. MicroRNAs regulate CYP3A4 Expression via Direct and Indirect Targeting. *Drug Metab Dispos*, 37(10):2112-2117.
- Parkinson Andrew. 1996. An Overview of Current Cytochrome P450 Technology for Assessing the Safety and Efficacy of New Materials. *Toxicol Pathol*, 24(1):45-57.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ. 2000. Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274:707-713.
- Pelkonen P, Lang M, Pasanen M. 1994. Tissue and sex-dependent differences in CYP2A activities in hamsters. *Arch Toxicol*, 68(7):416-22.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. 2008. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes:current status. *Arch Toxicol*, 82:667-715.
- Persson KP, Ekehed S, Otter C, Lutz ESM, McPheat J, Masimirembwa CM, and Andersson TB. 2006. Evaluation of Human Liver Slices and Reporter Gene Assays as Systems for Predicting the Cytochrome P450 Induction Potential of Drugs in Vivo in Humans. *Pharmaceutical Research*, 23(1):56-69.
- Pohl RJ, Fouts JR. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxy-resorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem*, 107:150-155.
- Rappolee DA, Mark D, Banda MJ, Werb Z. 1988. Wound macrophages express TGF- α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, 241:708-712.
- Reinhardt M. 2009. Einfluss von Dexamethason auf die CYP1A1-Induktion in vitro durch den Modellinduktor β -Naphthoflavon (BNF) an Rattenleberschnitten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

- Shaban Z, El-Shazly S, Abelhady S, Fattouh I, Muzandu K, Ishizuka M, Kimmura K, Kazusaka A, Fujita S. 2004. Down regulation of hepatic PPAR α function by AhR ligand. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66:1377-1386.
- Shaban Z, Soliman M, El-Shazly S, El-Bohi K, Abdelazeez A, Kehel K, Kim HS, Muzandu K, Ishizuka M, Kazusaka A, and Fujita S. 2005. AhR and PPAR α : antagonistic effects on CYP2B and CYP3A, and additive inhibitory effects on CYP2C11. *Xenobiotica*, 35(1):51-68.
- Shiverick KT. 1981. In vivo and in vitro effects of beta-naphthoflavone on cytochrome P-450-dependent testosterone hydroxylase activities in liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 9(6):545-50.
- Silva JM, Morin PE, Day SH, Kennedy BP, Payette P, Rushmore T, Yergey JA, Nicoll-Griffith DA. 1998. Refinement of an in vitro cell model for cytochrome P450 induction. *Drug Metab Dispos*, 26(5):490-6.
- Smith PF, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Putnam CW, Zukoski CF, Davis WM, Brendel K. 1985. Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology. *Life Sci*, 36:1367-75.
- Smith PF, Fisher R, Shubat PJ, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, and Brendel K. 1987. In vitro cytotoxicity of allyl alcohol and bromobenzene in a novel organ culture system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 87:509-522.
- Sonderfan AJ, Arlotto MP, Dutton DR, McMillan SK, Parkinson A. 1987. Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*, 255:27-41.
- Sonneveld E, Jonas A, Meijer OC, Brouwer A, and Van der Burg B. 2007. Glucocorticoid-Enhanced Expression of Dioxin Target Genes through Regulation of the Rat Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicological Sciences*, 99(2):455-469.
- Squires E, Sueyoshi T, Negishi M. 2004. Cytoplasmic Localization of Pregnane X Receptor and Ligand-dependent Nuclear Translocation in Mouse Liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47):49307-49314.

- Stanley LA, Horsburgh BC, Ross J, Scheer N, Wolf CR. 2006. PXR and CAR: nuclear receptors which play a pivotal role in drug disposition and chemical toxicity. *Drug Metab Rev*, 38:515-597.
- Strobel HW, Lu AHY, Heidema J, Coon MJ. 1970. Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and fatty acid, hydrocarbon and drug hydroxylation. *J. Biol.Chem.*, 245:4851-4854.
- Sueyoshi T, Negishi M. 2001. Phenobarbital response elements of Cytochrome P450 Genes and nuclear receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41:123-43.
- Surry DD, McAllister G, Meneses-Lorente G and Evans DC. 1999. High throughput ribonuclease protection assay for the determination of CYP3A mRNA induction in cultured rat hepatocytes. *Xenobiotica*, 29(8):827-838.
- Tang C, Lin JH, and Lu AYH. 2005. Metabolism-based drug-drug interactions: what determines individual variability in cytochrome P450 induction? *Drug Metab Dispos*, 33:603-613.
- 't Hoen PAC, Commandeur JNM, Vermeulen NPE, Van Berkel TJC and Bijsterbosch MK. 2000. Selective Induction of Cytochrome P450 3A1 by Dexamethasone in Cultured Rat Hepatocytes - Analysis with a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Biochemical Pharmacology*, 60:1509-1518.
- Thummel KE, Wilkinson GR. 1998. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38:389-430.
- Wagener J. 2005. Induktion der Cytochrom-P450-Isoformen CYP3A1/2 durch Dexamethason (Dexa) und Pregnenolon-16alpha-Carbonitril (PCN) in Leberpräzisionsschnitten der Ratte [Dissertation]. Jena:Friedrich-Schiller-Universität.
- Wang T, Brown MJ. 1999. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Analytical Biochemistry*, 269:198-201.

- Wauthier V, Verbeeck RK and Calderon PB. 2004. The use of precision-cut liver slices from male Wistar rats as a tool to study age related changes in CYP3A induction and in formation of paracetamol conjugates. *Toxicology in Vitro*, 18:879-885.
- Waxman DJ, Morrissey JJ, Naik S, Jauregui HO. 1990. Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem J.*, 271(1):113-9.
- Waxman DJ. 1999. P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369(1):11-23.
- Wortham M, Czerwinski M, He L, Parkinson A, Wan YJ. 2007. Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4 alpha, and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver. *Drug Metab Dispos*, 35(9):1700-10.
- Wrighton SA, Schuetz EG, Watkins PB, Maurel P, Barwick J, Bailey BS, Hartle HT, Young B, and Guzelian P. 1985. Demonstration in Multiple Species of Inducible Hepatic Cytochromes P-450 and Their mRNAs Related to the Glucocorticoid-Inducible Cytochrome P-450 of the Rat. *Molecular Pharmacology*, 28:312-321.
- Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. 2004. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics*, 5:243-272.
- Yamazoe Y, Murayama N, Shimada M, Yamauchi K, Nagata K, Imaoka S, Funae Y, Kato R. 1988. A sex-specific form of cytochrome P-450 catalyzing propoxycoumarin O-depropylation and its identity with testosterone 6 beta-hydroxylase in untreated rat livers: reconstitution of the activity with microsomal lipids. *Journal of Biochemistry*, 104(5):785-90.

Anhang

Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau PD Dr. med. Reinhild Glöckner für die Möglichkeit zur Promotion mit dem zur Verfügung gestellten Forschungsthema. Ihrer exzellenten fachlichen Betreuung, der konstruktiven Kritik und vor allem der Geduld bei der Fertigstellung der Dissertationsschrift gebührt eine besondere Wertschätzung.

Danken möchte ich auch dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter damaliger Leitung von Herrn Prof. Dr. Dieter Müller für die Bereitstellung der Einrichtungen, Materialien und Tiere. Zusätzlich danke ich Herrn Prof. Müller für die Durchsicht des Manuskripts.

Frau Otum, Frau Guder, Frau Karge, Frau Stadler und Frau Meuche danke ich sehr für das geduldige Einarbeiten im Labor, für die zahlreichen Tips während der Labortätigkeit und auch das sehr angenehme Arbeitsklima.

Im Privaten danke ich besonders Katharina Nowak und Rosmarie Hofmann für die Freundschaft, die unvergessliche Studienzeit, den geistigen Austausch, der Motivation und Unterstützung nicht nur für die vorliegende Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Lüsiye und Iskender Demirdag und meinen Geschwistern Can, Cenet und Sonja bedanken, die mir durch ihre Unterstützung das Medizinstudium erst ermöglichen konnten.

Thomas Demirdag

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

PD Dr. med. Reinhild Glöckner,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Sarnen, 18. Februar 2010

Thomas Demirdag, Verfasser